

**Gyógyszermolekulák és ABC transzporterek
kölcshatásának vizsgálatára
alkalmas *in vitro* rendszerek fejlesztése és validálása**

Ph.D. értekezés

Kis Emese

Témavezető: Dr. Krajcsi Péter
Belső konzulens: Prof. Kovács L. Kornél

Biológia Doktori Iskola
Biotechnológia Tanszék, SZTE TTIK
Solvó Biotechnológiai ZRt.
2010, Szeged

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	3
2	Bevezetés	5
2.1	<i>Az ABC transzporterfehérjék.....</i>	5
2.2	<i>Az ABC transzporterek szerkezete.....</i>	6
2.3	<i>Az ABC transzporterek lokalizációja.....</i>	12
2.3.1	<i>Az ABC transzporterek lokalizációja a sejtmembrán eltérő koleszterintartalmú régióiban</i>	12
2.4	<i>Az ABC transzporterek funkciói.....</i>	13
2.4.1	<i>Az ABC transzporterek fiziológiás funkciói.....</i>	13
2.4.2	<i>ABC transzporterek és a multidrog rezisztencia (MDR).....</i>	14
2.4.3	<i>A multidrog rezisztencia szerepe a reumatoid arthritis terápiájában</i>	16
2.4.4	<i>Az ABC transzporterek szerepe a gyógyszermolekulák ADME-Tox tulajdonságaiban.....</i>	18
2.5	<i>A dolgozatban részletesen vizsgált ABC transzporterek.....</i>	20
2.5.1	<i>ABCG2/MXR/BCRP</i>	20
2.5.2	<i>ABCB11/sP-gp/BSEP</i>	21
2.6	<i>Az ABC transzporterek vizsgálatára alkalmas tesztrendszer</i>	22
2.6.1	<i>In vitro módszerek</i>	22
2.6.2	<i>Membrán vezikula alapú vizsgálatok</i>	22
2.6.3	<i>Sejtes vizsgálatok.....</i>	25
2.6.4	<i>In vivo módszerek</i>	26
3	Célkitűzések.....	28
4	Anyagok és módszerek	29
5	Eredmények.....	35
5.1	<i>Új szubsztrát-transzporter kölcsönhatások detektálása és karakterizálása HT in vitro esszéekkel</i>	35
5.1.1	<i>Az ABCG2 és leflunomid közötti specifikus kölcsönhatás karakterizálása</i>	35
5.1.2	<i>A leflunomid és az A771726 kölcsönhat az ABCG2-vel</i>	36
5.1.3	<i>A leflunomid és az A771726 az ABCG2 szubsztrátjai</i>	37
5.2	<i>A koleszterin hatása az egér, a patkány és humán ABCB11 transzporter működésére.....</i>	40
5.2.1	<i>A koleszterin hatása az Sf9 sejtekből preparált membrán ABCB11/Abcb11 tartalmára</i>	40
5.2.2	<i>A koleszterin hatása az ABCB11/Abcb11 fehérjék működésére</i>	41
5.2.3	<i>Koleszterikus gyógyszerek hatása az ABCB11/Abcb11-HAM általi TC, GC, TCDC, GCDC transzportra</i>	45
5.2.4	<i>Koleszterikus gyógyszerek hatása a humán ABCB11 és ABCB11-HAM általi TC transzportra</i>	46
5.3	<i>Az egér Abcb11-HAM membrán ATPáz esszéjének kifejlesztése</i>	47
5.3.1	<i>A sejtmembrán koleszterintartalom növekedésének hatása az egér Abcb11 transzporter ATPáz működésére</i>	48
5.3.2	<i>Az egér Abcb11-HAM transzporter ATPáz esszéjének optimalizálása.....</i>	48
5.3.3	<i>Az egér Abcb11-HAM transzporterrel kölcsönható molekulák detektálása ATPáz és VT esszében</i>	50
6	Megbeszélés	51
7	Az eredmények jelentősége	57
8	Köszönetnyilvánítás	58
9	Összefoglaló	59
10	Summary	66
11	Irodalomjegyzék	73

1 Rövidítések jegyzéke

Az értekezésben az ABC transzporterek szisztematikus nomenklatúráját alkalmaztuk, kivételt jelent ez alól azon membránpreparátumok és sejtvonalak nevei, ahol a gyártó másképpen járt el.

5-ASA: 5-aminosalicylic acid;

ABC transzporter: ATP-Binding Cassette transzporter;

ADME: Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion;

ATP: adenosine triphosphate;

BBB: blood-brain-barrier;

BCRP, MXR, ABCP: ABCG2;

BSEP, ABCB11, sP-gp: bile salt export pump;

CEM: human T-lymphoblastoid cells;

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator;

CHO: chinese hamster ovary cells;

CNS: central nervous system;

CSF: cerebrospinal fluid;

DMARD: disease modifying anti-rheumatic drug;

DMSO: dimethyl sulfoxide;

EHBR: eisai hyperbilirubinemic rat;

GC: glycocholate;

GCDC: glycochenodeoxycholate.

H69: human small cell lung cancer cells

HAM: high activity membrane;

HBSS: Hanks balanced salt solution;

HEK293: human embryonic kidney cells;

HIV: human immunodeficiency virus;

HL60: human promyelocytic leukemia cells;

HPLC: high performance liquid chromatography;

HT: high-throughput;

K562: human myelogenous leukemia cells;

KB: human epidermoid carcinoma cells;

MCF7: human breast adenocarcinoma cells;

MDCK: Madin-Darby canine kidney cells;
MDR: multidrug resistance;
MDR1, P-gp: ABCB1;
MRP: multidrug resistance associated protein;
MRP1: ABCC1;
MTX: methotrexate;
Na₃VO₄: sodium orthovanadate;
NBD: nucleotide binding domen;
NEM-GS: N-ethylmaleimide glutathione;
NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug;
PFIC2: progressive intrahepatic cholestasis;
PLB985: human myelomonoblastic leukemia cells;
RA: rheumatoid arthritis;
RAMEB: randomly methylated cyclodextrin;
Sf9: *Spodoptera frugiperda* ovarian cells;
TC: taurocholate;
TCDC: taurochenodeoxycholate;
TMD: transmembrane domen;
UMP: uridine monophosphate;
VT: vesicular transport.

2 Bevezetés

2.1 Az ABC transzporterfehérjék

Már egy 1970-es évek közepén megjelent publikációban is leírták, hogy kínai hörcsög ovárium epiteliális sejteket (CHO) kolhicinnel szelektálva a rezisztencia nemcsak a szelektáló ágenssel szemben alakul ki, hanem más, általuk vizsgált amfipatikus gyógyszermolekulával szemben is, ezek közé tartozik pl. a vinblasztin, kolcemid, daunomycin, pluromycin¹. Ezekben a rezisztens sejtekben Juliano és munkatársai azonosítottak egy 170 kDa méretű glikoproteint, amelynek a megváltozott drogpermeabilitás tulajdonítható volt, hiszen a vadtypusú sejtek membránjában nem volt megtalálható ez a fehérjetípus. Az így módon felfedezett membránfehérjét permeabilitás glikoproteinnek (P-glikoproteinnek, P-gp/MDR1/ABCB1) nevezték el². Ez a felismerés magyarázatot adhatott arra a tényre is, amely már évtizedek óta ismeretes volt: miért válik rezisztenssé egy adott citosztatikummal kezelt tumor egy másik, szerkezetileg akár teljesen eltérő szerre is. Az elkövetkező években különböző laborok számos olyan szelektált sejtvonalat állítottak elő, amelyek keresztrezisztenciát mutattak más citosztatikumokkal, antibiotikumokkal, szteroid hormonokkal, kalcium-csatorna blokkolókkal stb. szemben. A hasonlóság ezekben a sejtvonalakban az volt, hogy minden esetben ki tudták mutatni az ABCB1 jelenlétét a sejtmembránban.

1986-ban Shen és kutatócsoportja kolhicinnel szelektált humán KB karcinoma sejteket vizsgálva azt tapasztalta, hogy a multidrog rezisztencia kialakulása megemelkedett *mdr1* mRNS szinttel jár együtt. Még ebben az évben bebizonyították, hogy az *mdr1* gén kódolja az ABCB1 fehérjét, a cDNS teljes szekvencia analízisét követően pedig homológiát fedeztek fel az ABCB1 és néhány bakteriális transzportfehérje között, illetve azonosították a fehérje két nukleozid-trifoszfát kötőhelyét is^{3,4,5,6,7}. Ezek a felismerések azt sugallták, hogy az ABCB1 közvetlenül vesz részt a transzportfolyamatokban, aktív transzporterként ATP-t hidrolizálva. Ezt a tényt Hamadának sikerült igazolnia azzal, hogy a proteint enzimátikus funkcióját megőrizve tisztította adriamycin rezisztens K562 humán leukémia sejtvonalból⁸.

Cole és munkatársai 1992-ben doxorubicinnal szelektált tüdőrák sejtvonalban, a H69AR-ben – amely keresztrezisztenciát mutatott számos citosztatikummal szemben – nem tudtak ABCB1 expressziót kimutatni, viszont egy másik fehérje megemelkedett mRNS szintjét tapasztalták az anyasejtvonalhoz képest. Ez a fehérje szintén az ABC transzporterek családjába tartozó MRP

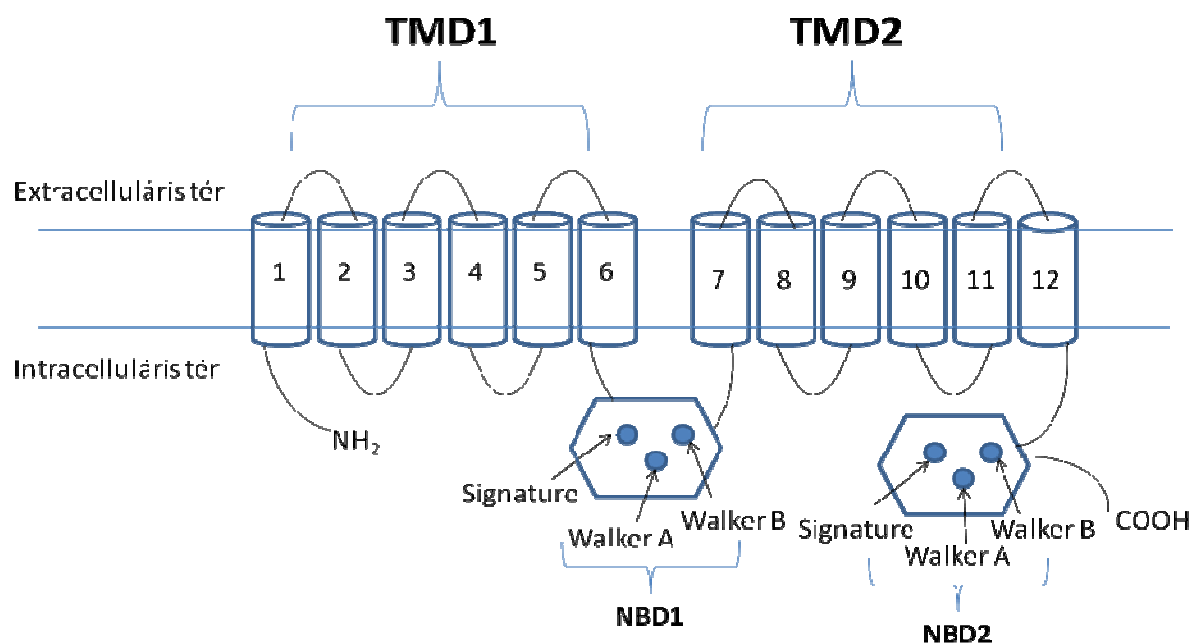
(multidrug resistance associated protein), amelynek a multidrogrezisztencia kialakulása tulajdonítható volt ebben a szelektált sejtvonalban⁹.

Az elmúlt másfél évtizedben sorra azonosították az ABC transzporter fehérjecsalád tagjait, amelyek az élővilágban rendkívül széleskörűen fordulnak elő a mikrobáktól az emberig. A kutatási eredmények jelenlegi állása szerint az ABC transzporter családnak az emberi szervezetben 49 tagja van^{10,11,12}.

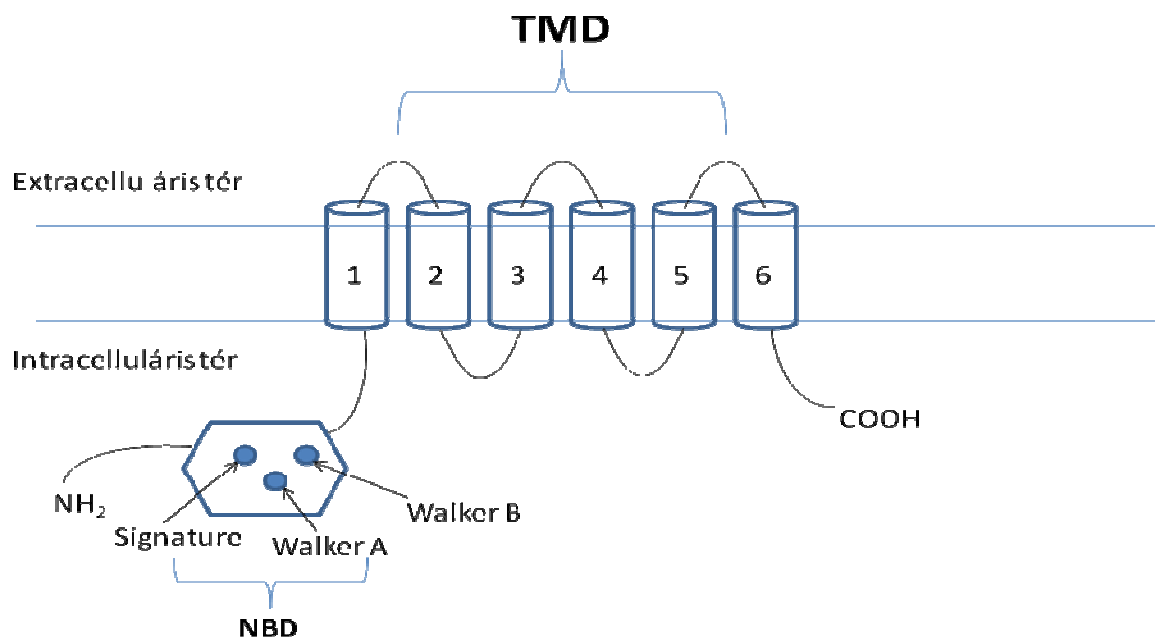
Fény derült arra is, hogy egyes öröklődő betegségek kapcsolatban állnak bizonyos ABC transzporterek mutációival. 1989-ben Riordan és munkatársai azonosították az egyik leggyakrabban előforduló, recesszíven öröklődő, autoszómális betegség, a cisztás fibrózis kialakulásáért felelős gént, a CFTR-t, amely szintén egy ABC fehérjét kódol¹³. Az elmúlt években több genetikai betegségről bizonyították be, hogy kialakulásában szerepet játszik az adott ABC fehérje teljes vagy részleges működésképtelensége. Ilyen – néhány példát kiragadva – a lipidhomeosztázisban fontos szerepet játszó ABCA1 mutációjának következtében kialakuló Tangier-kór, az ABCC2/MRP2 funkcióserülése következtében megjelenő Dubin-Johnson szindróma, valamint a viszonylag ritka pseudoxanthoma elasticum, amely az ABCC6/MRP6 mutációjának eredményeképpen lép fel^{14,15,16,17}.

2.2 Az ABC transzporterek szerkezete

Alapvetően az ABC fehérjecsalád tagjaira jellemző, hogy rendkívül konzervált ATP kötő doménekből (NBD) és a membránon átívelő, transzmembrán régiókból (TMD) épülnek fel. Emlősökben a funkcionálisan működő ABC transzporterek legtöbbször két nukleotidkötő doménből és két transzmembrándoménből állnak. Ez a négy alegység az ún. egésztranszporterek esetében egy polipeptidláncon helyezkedik el (1. ábra), de megkülönböztetünk ún. féltranszportereket is (2. ábra), amelyek egy ATP kötő doménből és egy TMD-ből épülnek fel. Ezek a féltranszporterek homo-, vagy heterodimerizáció révén válnak működőképes fehérjékké¹⁸. Megemlítendő, hogy egyes ABC fehérjék, mint pl. az MRP alcsalád néhány tagja egy 5 transzmembrán hélixből álló addicionális TMD-t tartalmaz¹⁹.



1.ábra Két TMD-ből és két NBD-ből felépülő egésztranszporter



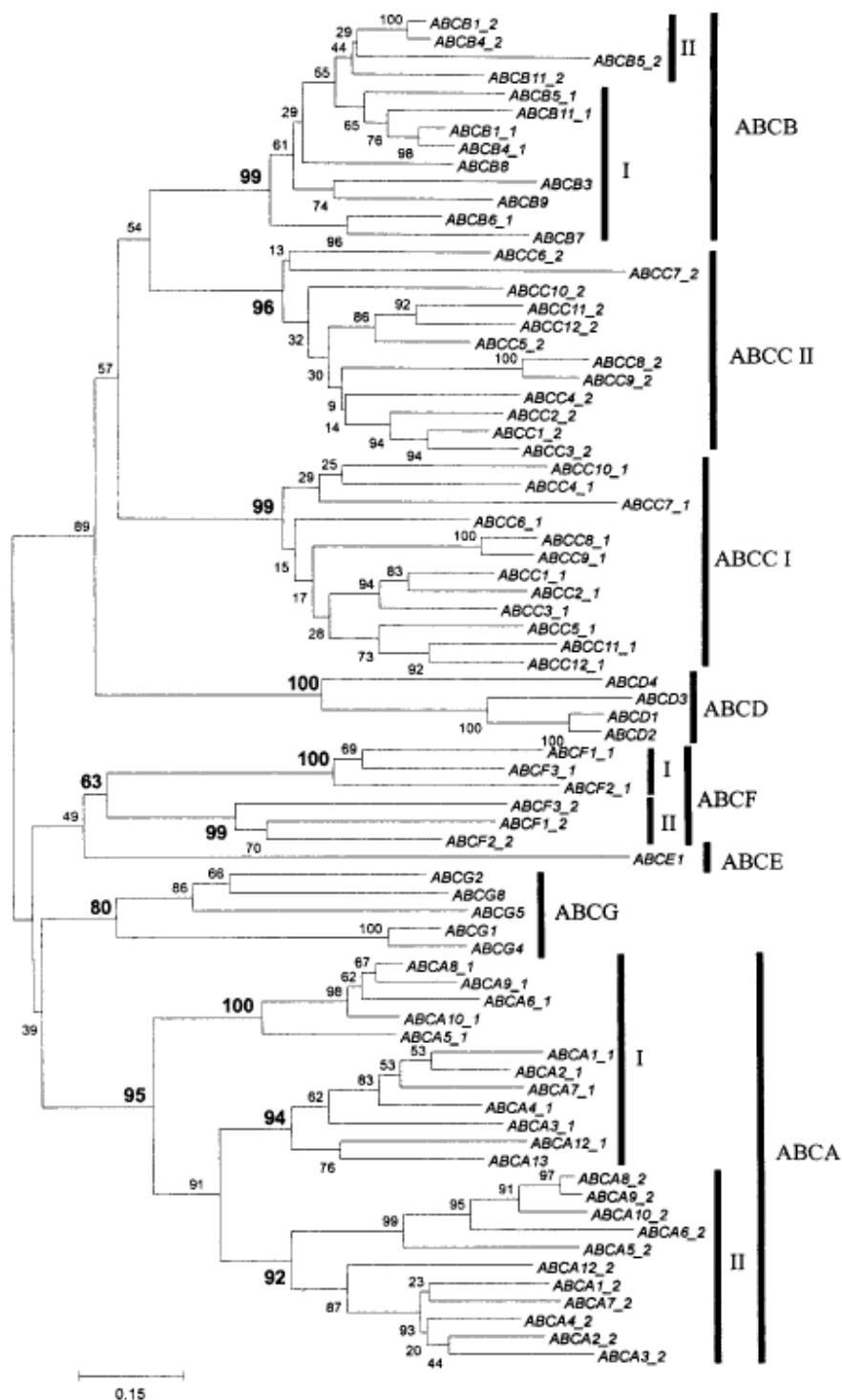
2.ábra Egy TMD-ből és egy NBD-ből felépülő féltranszporter

A transzmembrándomének – amelyek egyenként hat α -hélixből épülnek fel – alkotják az ABC transzporterek működésének alapját. Ugyanis ezek a polipeptidláncok a membránon áthatolva,

specifikusan az adott fehérjére jellemző csatornát alkotva biztosítják szubsztrátjaik számára az átjutást a membrán egyik oldaláról a másikra.

Az ABC proteinek, mint aktív transzporterek az ATP hidrolíziséből nyerik az energiát. Az ATP a citoplazmában elhelyezkedő nukleotidkötő doménhez kapcsolódik és a hidrolíziséből származó energia fordítódik a közvetlenül a NBD-hez kapcsolódó transzmembrán domén konformációváltozására, így a szubsztrát transzportjára^{10,11,20}.

Az emberei szervezetben előforduló 49 ABC fehérjét az 3.ábrán látható filogenetikai fa segítségével szemléltetett szekvenciahomológia alapján 7 alcsaládba, ABCA-tól ABCG-ig sorolták¹⁰.



3.ábra: Az ABC transzporterek filogenetikai fája a fehérje ATP kötő doménjének alapján. Az I és II jelölések arra utalnak, hogy egyes fehérjécsaládok egy, míg mások két ATP kötő doménnal rendelkeznek. Az elágazási pontoknál lévő számok a bootstrap értékekre utalnak.

ABCA alcsalád

Az ABCA alcsaládba – amelyet további két alcsoportra lehet osztani a kromoszómákon való elhelyezkedés alapján – 12 egész transzporter és a legnagyobb mólsúlyú ABC fehérjék többsége tartozik. Az egyik legjobban jellemzett tagja az ABCA1 protein, amelynek feladatai közé tartozik a felesleges koleszterin és foszfolipidek eltávolítása a sejtekből²¹. A lipidhomeosztázis fenntartásában vesz részt az ABCA7 fehérje is²².

ABCB alcsalád

Ez a legváltozatosabb ABC alcsalád: tartalmaz mind egész- és féltranszportereket, vannak közöttük gyógyszer-, vas- és speciális fehérjetranszporterek is. Az ABCB alcsalád tagjai változatos előfordulásúak, a plazmamembránon kívül az endoplazmatikus retikulumban, lizoszómális és mitokondriális membránokon is megtalálhatóak. Ebbe a családba tartozik a legismertebb és legjobban jellemzett ABC fehérje, az ABCB1 is, amelyet elsőként hoztak kapcsolatba a multidrog rezisztenciával. Az ABCB2/TAP1 és a ABCB3/TAP2 féltranszporterek heterodimerként, mint peptid transzporterek vesznek részt az MHC-I függő antigén prezentációban. Az ABCB4 és – a később részletesen jellemzett – ABCB11/BSEP fehérjék vesznek részt a foszfatidilkolin és az epe sók transzportjában. Az ABCB6-8 fehérjék funkciója még nem teljesen ismert, ezek ABC féltranszporterek és leginkább a mitokondrium belső membránjában foglalnak helyet¹¹.

ABCC alcsalád

Az alcsalád mind a 12 tagja hasonló struktúrával rendelkező egésztranszporter. Bár szerkezetileg hasonlítanak, funkcióik és molekuláris mechanizmusaik nagyon eltérőek. Vannak közöttük aktív ATP függő transzporterek, regulátor ioncsatornák és kálium-csatornák permeabilitását moduláló fehérjék is. Az MRP1/ABCC1 volt a második ABC transzporter, amelyet kapcsolatba hoztak a tumorok multidrog rezisztencia jelenségével^{9,23,24,25}. Szubsztrátjai közé tartozik pl. a daunorubicin, doxorubicin, vinkrisztin, kolhicin, de nagyon hasonló profilt mutat az ABCB1-gyel is. Az ABCC1-re és a család további négy tagjára (ABCC2, ABCC3, ABCC6 és ABCC7) jellemző, hogy a többi ABC transzportertől eltérően nem két, hanem három TMD-t tartalmaznak. Az ABCC1 különböző molekulák, drogok glutation, glukoronát és szulfát konjugátumainak, valamint organikus anionok transzportjára képes, de részt vesz egy rendkívül fontos szignalizációs molekula, a LeukotriénC4 szállításában is^{26,27,28}. Számos külső és belső mérgező anyag válik semlegessé a korábban említett vegyületekkel kapcsolódva, amelyeket aztán az ABCC2 választ ki az epébe és a vizeletbe. Az

ABCC3 szintén szerves anionokat transzportál, főleg a glukoronát konjugátumok a szubsztrátjai. Az ABCC4, ABCC5 és ABCC6 fehérjékről is bebizonyosodott, hogy aktív transzporterek, így részt vesznek nukleozid analógok (ABCC4), nukleozid monofoszfát analógok (ABCC5) és glutation konjugátumok (ABCC6) transzportjában.

A SUR1/ABCC8 a Langerhans-szigetek felszínén levő ATP függő kálium-csatornák expresszióját és funkcióját szabályozza, ezáltal befolyásolva a szervezet inzulin szintjét¹¹.

ABCD alcsalád

Ez a család négy ABC féltranszportert foglal magába. A peroxisómális membránban helyezkednek el, így ezek génjeinek mutációja peroxisómális betegségek kialakulását eredményezi. A leggyakoribb a nemi X kromoszómához kötötten öröklődő adrenoleukodystrophia, melynek során telített zsírsavak halmozódnak fel a sejtekben. Ezt a betegséget az ALD/ABCD1 gén mutációja okozza¹¹.

ABCE és F alcsalád

Ezek az alcsaládok nukleotidkötő doménekkel rendelkeznek, viszont nem azonosítottak bennük transzmembrándoméneket, így jelenleg nem ismerjük transzporttal kapcsolatos funkcióikat.

ABCG alcsalád

A humán ABCG alcsalád mind a 6 tagja jellegzetes domén szerkezettel rendelkező fél transzporter, ugyanis a transzmembrán domének a C-terminálison, míg a nukleotidkötő domének az N-terminálison helyezkednek el. Ezek a fehérjék jelentős szerepet játszanak mind a sejtek lipid anyagcseréjében, mind a gyógyszerek farmakokinetikájában.

Az ABCG1 szerepet játszik a lipid metabolizmusban a lipoproteinek és a koleszterin transzportálásával a makrofágokban. ABCG1 expresszióját írták le a lépben, a szívben, a májban, a tüdőben, a vesében, a vázizmokban, az agyban és a placentában. A később részletesen tárgyalt BCRP/ABCG2/MXR/ABCP a család legismertebb és legjobban jellemzett tagja.

Az ABCG4 szerepe és szerkezete is nagyon hasonló az ABCG1-hez, részt vesz a retinoidok célba juttatásában¹¹.

Az ABCG5 és ABCG8 heterodimert alkotó féltranszporterek, szintén a lipid homeosztázis szereplői, transzportálják a szitoszterolokat és a koleszterin származékokat is. Bármelyikük mutációja a szitoszterolemia nevű ritka örökletes betegséget okozza²⁹.

2.3 Az ABC transzporterek lokalizációja

Az ABC transzporterekről általában elmondható, hogy a sejtek plazmamembránjában expresszálódnak, ezalól kivételt képeznek a peroxiszómában lokalizálódó D alcsalád tagjai, a B alcsalád mitokondriális membránban expresszálódó tagjai, valamint a szintén odatartozó TAP1 és a TAP2, amelyek az endoplazmatikus retikulumban fordulnak elő^{30,31,32}. Az ABCB1 a sejtek apikális membránjában fejeződik ki, szemben az ABCC1-gyel, amely a bazolaterális oldalon található meg³³. A hepatociták kanalikuláris membránjában foglal helyet az ABCC2, ABCB4 és ABCB11, míg a bazolaterális membránban az ABCC3 és ABCC5. Apikális expresszió figyelhető meg az ABCG2 esetén is³⁴.

2.3.1 Az ABC transzporterek lokalizációja a sejtmembrán eltérő koleszterintartalmú régiókban

Az utóbbi évek kutatásai világítottak rá arra tényre, hogy a sejtmembránt nem tekinthetjük egy homogén lipid kettősrétegnek, hiszen különböző lipidekben és fehérjékben gazdag régiókból, doménekből épül fel. Raftoknak vagy kaveoláknak nevezik azokat a 10-200 nm nagyságú struktúrákat, amelyek rendkívül gazdagok szfingolipidben és koleszterinben, valamint rezisztensek olyan nemioinos detergenssel szemben, mint a Triton X-100^{35,36}. Ezekről a mikrodoménekről bebizonyították azt is, hogy bennük számos különböző fehérje lokalizálódik, pl. az ABC transzporterek közül az ABCB1, az ABCC1, az ABCC2 és az ABCG2^{37,38,39}.

Troost és munkatársai *in vitro* és *ex vivo* kísérletek alapján írták le, hogy az ABCB1 működését befolyásolja a sejtmembrán koleszterintartalma, mások megnövekedett kaveola mennyiséget tapasztaltak a multidrogrezisztens tumoros sejtvonalakban^{40,41}.

Korábbi tanulmányok rávilágítottak arra a tényre, hogy az Sf9 rovarsejtek membránjának megközelítőleg 20-szor alacsonyabb a koleszterintartalma az emlős sejtek plazmamembránjához képest⁴².

Laboratóriumunkban elvégzett kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az ABCG2 fehérje működését jelentős mértékben befolyásolja az alkalmazott expressziós rendszer. Megfigyeltük, hogy az ABCG2-t expresszáló Sf9 sejtekből készült membránpreparátumok (BCRP-Sf9) az ismert ABCG2 szubsztrátok legtöbbszörrel nem aktiválhatók az alapaktivitás fölé, szemben az ABCG2-t

emlős sejtekben kifejezett preparátumokkal (BCRP-M). Specifikus ABCG2 inhibitor – Ko134/Ko143 – alkalmazva az alapaktivitás csökkenthető, így a BCRP-Sf9 membránpreparátum is alkalmassá tehető a szubsztrátok detektálására⁴³.

Később ABCG2-t expresszáló Sf9 sejtekből preparált membránvezikulákon végzett ATPáz kísérletekkel igazoltuk, hogy a membránkörnyezet koleszterintartalma pozitívan befolyásolja a fehérje működését, ezáltal a koleszterinnel feltöltött BCRP-HAM-Sf9 (High Activity Membrane) membránpreparátumok ugyanolyan jól használhatóvá válnak, mint az emlős rendszerek⁴⁴. Feltételeztük, hogy a koleszterin potencírozó hatása azt jelzi, hogy fiziológiásan a ABCG2 is a koleszterinben gazdag raft és caveola membrán mikrodoménekben helyezkedik el. Nem sokkal később Storch és kutatócsoportja ABCG2-t expresszáló MDCKII sejteken igazolta feltevésünket, és megmutatták a membrán caveolin-1 és a transzporterfehérje közötti kolokalizációt, funkcionális kapcsolatot³⁹.

2.4 Az ABC transzporterek funkciói

2.4.1 Az ABC transzporterek fiziológiás funkciói

A 80-as évek végétől számos publikáció látott napvilágot, amely az ABC transzporterek normál szövetekben való lokalizációját és fiziológiás funkcióját tanulmányozta. E tanulmányok alapján körvonalazódott, hogy ezen fehérjecsalád egyes tagjainak fiziológiás funkciója rendkívül szerteágazó; magába foglalja többek között a detoxifikációt (ABCB1, ABCC1), a xenobiotikumokkal és oxidatív stresszel szembeni védelmet (ABCC család tagjai), a lipid metabolizmusban való részvételt (ABCA1, ABCB4, ABCG család tagjai), valamint az antigénprezentációt is (TAP1, TAP2) stb.

Schinkel és munkatársai 1994-ben megjelent publikációjukban az általuk előállított Mdr1a (-/-) egérrel kapcsolatos vizsgálataikról számoltak be. Ez az állat élet- és szaporodóképes volt, abban az esetben viszont, ha a központi idegrendszerre toxikus peszticiddel, az ivermectinnel kezelték akkor 100- szor érzékenyebbé vált a vad típusú egyedekhez képest. Összehasonlítva az Mdr1 (+/+) állatokból származó mintákkal, a knockout egér szöveteiben – különösen az agyban – szignifikánsan magasabb ivermectin koncentrációt mértek⁴⁵. Ez a tanulmány volt az első, amely bizonyította az ABCB1, így az ABC transzporterek szerepét a szervezet toxinokkal szembeni

védelmében. Az ABCB1 a bélnyálkahártya sejteiben expresszáldva megakadályozza a káros anyagok bejutását a testbe, hatásos védelmet nyújt a vér-agy-gátat (BBB) alkotó sejtekben, a placenta trophoblastban, a herében és a csontvelőben. A bél, a máj és vese sejteiben lokalizálódva szerepe van a szervezetre káros toxinok eliminációjában⁴⁶.

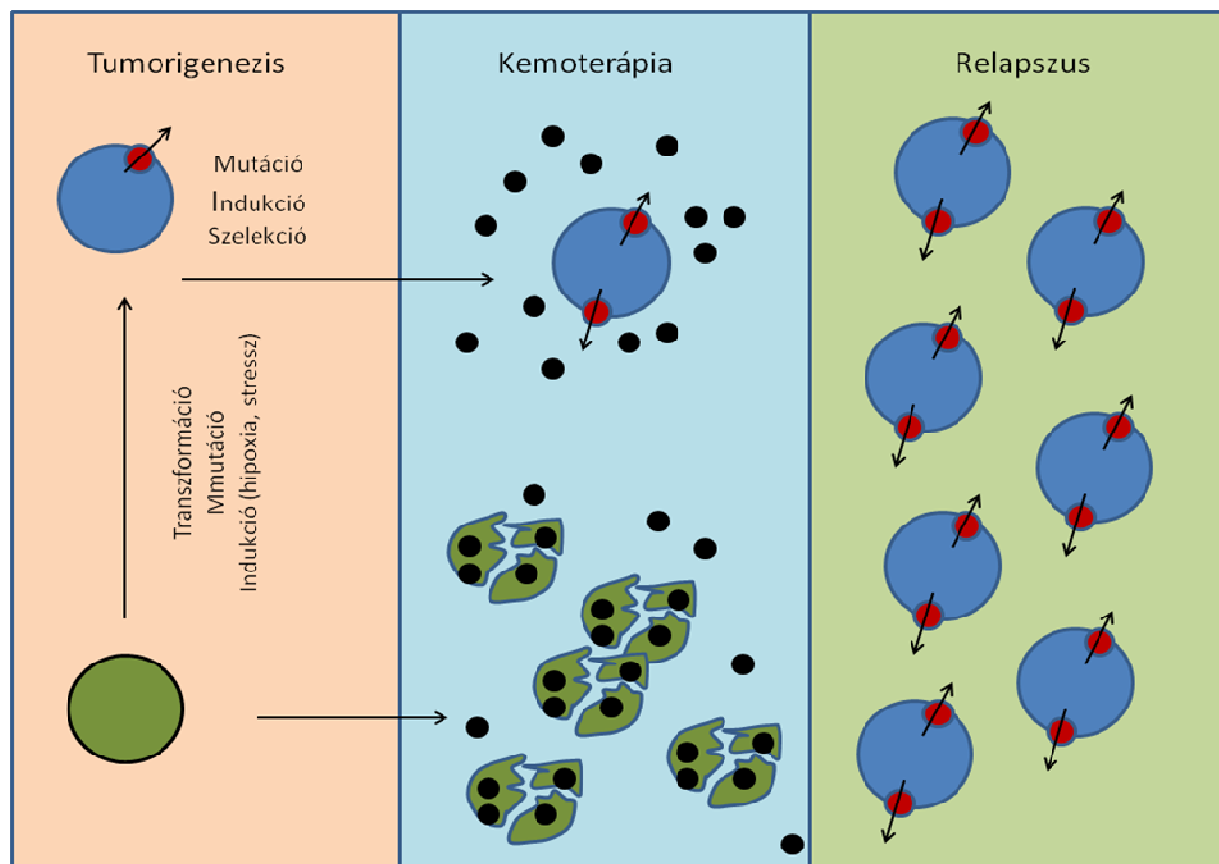
A choroid epitél sejtek bazolaterális membránjában megtalálható ABCC1 pedig a cerebrospinális folyadékot (CSF) védi meg a különböző veszélyes molekulákkal és drogokkal szemben, ahogy erre Wijnhold eredményei mutattak rá, amikor is az ABCC1 mediált etopozid transzportot vizsgálták a CSF-ből⁴⁷. Az ABCC1-hez hasonlóan az alcsalád több tagja is transzportál különböző konjugátumokat; mint a máj, vese vagy bél epiteliális sejtek apikális membránjában lokalizálódó ABCC2, amelynek fiziológias szubsztátjai közé tartozik pl. a bisglucuronosyl bilirubin, monoglucuronosyl bilirubin, vagy a polarizált sejtek bazolaterális membránjában kifejeződő ABCC3, amely elsősorban glukoronátokat eliminál a sejtekből. Az ABCC2-höz hasonlóan szintén apikális orientáltságú a később részletesen tárgyalt ABCB11 fehérje is, amelynek szerepe az, hogy a hepatocitákból az epébe transzportálja a különböző epesókat.

2.4.2 ABC transzporterek és a multidrog rezisztencia (MDR)

Habár az utóbbi évtizedekben az ABC transzporterek rendkívül széleskörű elterjedését és funkcióját azonosították, a tumorok multidrog rezisztenciája az, amely elsőként eszünkbe jut a fehérjecsalád említésekor.

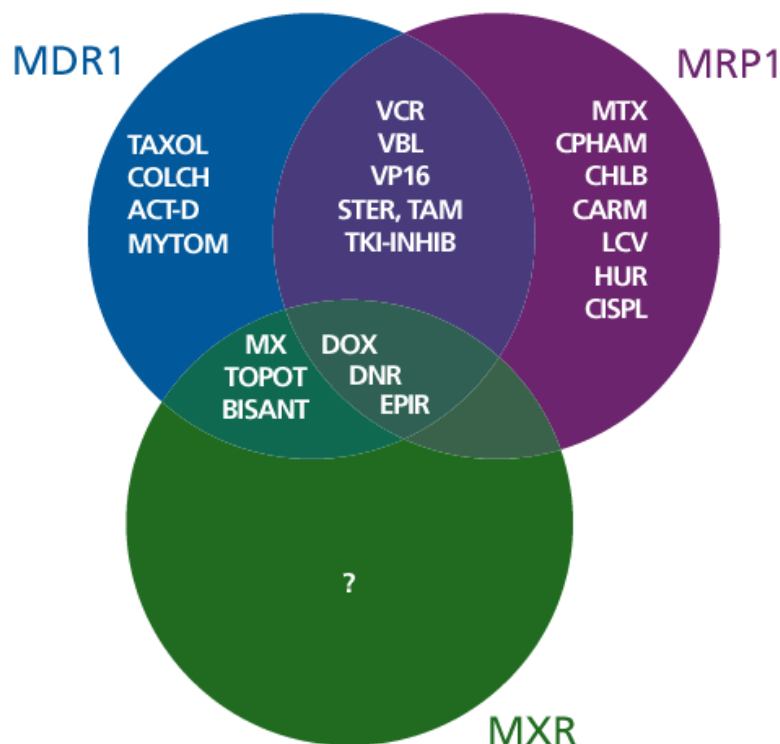
A piacon megjelenő újabb és újabb kemoterápiás szerek ellenére számos tumor típusnál a terápia hatékonysága még a mai napig meglehetősen alacsony. A kezelés hatékonysága nagyban függ attól, hogy a tumor mely szervben helyezkedik el, illetve hogy milyen az alkalmazott terápiás szer farmakokinetikája.

Az ABCB1 felfedezése óta nyilvánvalóvá vált, hogy egy, a membránban elhelyezkedő fehérje milyen jelentősen tudja befolyásolni az alkalmazott terápia eredményességét. Hiszen az ABCB1 expresszió szelekciós előnyt jelent a tumoros sejtnél a citosztatikumkezelés során, mivel az adott szerre, illetve más molekulákra is keresztrezisztens populáció fog túlélni és szaporodni (4.ábra)⁴⁸.



4.ábra: Az ABCB1 pozitív tumor kialakulása

A multidrog rezisztencia jelenség kapcsán három ABC transzportert emelhetünk ki, ezek az ABCB1, az ABCC1 és az ABCG2. Ezen fehérjék szubsztrátspecifitása a citosztatikumok körében meglehetősen átfedő, ahogy azt az 5.ábra is szemlélteti⁴⁹.



5. ábra: COLCH:colchicin, ACT-D: actinomycin-D, MYTOM:mitomicin, VCR: vincristin, VBL:vinblastin, STER: szteroid, TAM:tamoxifen, TKI-INHIB: tirozin-kináz inhibitor, MTX:metotrexát, CPHAM:ciklofoszfamid, CHLB:chlorambucil, CARM:carmustin, LCV:leucovorin, HUR: hidroxürea, CISPL: cisplatin, MX:mitoxantron, TOPOT: topotecan, BISANT: bisantron, DOX: doxorubicin, DNR: daunorubicin, EPIR: epirubicin

2.4.3 A multidrog rezisztencia szerepe a rheumatoid arthritis terápiájában

A multidrog rezisztencia jelensége a tumoros betegségek mellett más esetekben is szerepet játszik, így pl. a különböző gyulladásos, valamint autoimmun kórképek terápiájának hatékonyságát is jelentősen csökkentheti⁵⁰.

A rheumatoid arthritis (RA) egy olyan krónikus autoimmun betegség, amely az ízületek gyulladásával jellemezhető. A betegség kialakulásában több tényező bonyolult egymásra hatása vesz részt, ezért a rheumatoid arthritis kialakulásáért nem lehet egyetlen okot felelőssé tenni. Az ízületi gyulladás beindításában genetikai, környezeti tényezők és autoimmun jelenségek egyaránt részt vesznek.

Alapvetően három gyógyszermolekula csoport használatos a betegség kezelésére; a nem szteroid típusú gyulladáscsökkentők (NSAID), a kortikoszteroidok, valamint az ún. DMARD (disease modifying anti-rheumatic drug), vagy más néven bázisterápiás vegyületek^{51,52}. Ezek között több, a

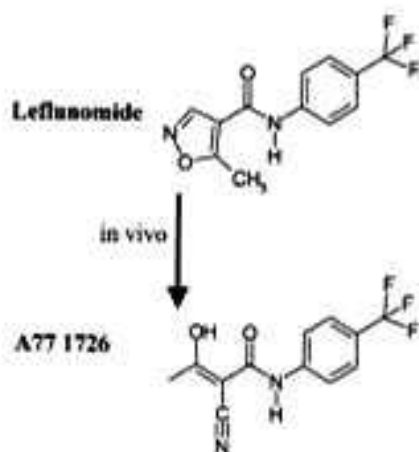
daganatterápiában is használatos gyógyszer (pl. metotrexát, ciklofoszfamid, metilprednizolon) is van. A DMARD-ok a RA kezelésében alkalmazott olyan elsővonalbeli szerek, melyek a tünetek enyhítésére és a strukturális károsodás progressziójának lassítására szolgálnak. Korai alkalmazásuk rendkívül fontos az ízületi deformitás és a rokkantság megelőzése érdekében. Ezen molekulákra jellemző, hogy hetekig, akár hónapokig is kell alkalmazni őket ahhoz, hogy hatékonyak legyenek. Ugyanakkor a hosszantartó alkalmazás során számos beteg esetében csökken a gyógyszerek hatékonysága, a páciensek egy része, – 5-10 % – pedig már esődlegesen is rezisztens egyes bázisterápiás szerekre^{53,54,55,56}. Ez a rezisztencia azonban meglehetősen összetett, köszönhető egyrészt az ABC transzportereknek, de a nem elégséges felszívódás, aktiváció és megnövekedett detoxifikáció is szerepet játszik^{57,58,59}.

Egyes tanulmányok prednizolon kezelés hatására megnövekedett ABCB1 expressziót figyeltek meg a perifériás limfocitákban, Llorente és munkatársai pedig a terápiára jól és nem reagáló pácienseknél tapasztaltak eltérő ABCB1 szinteket^{60,61,62}. Míg mások ABCC1-et detektáltak a kloroquinre rezisztens humán CEM T sejtekben⁶³. Azt is megfigyelték, hogy ha humán T limfocitákat szulfaszalazin jelenlétében tenyésztettek, akkor a rezisztens populáció ABCG2-t expresszált és leflunomidra is rezisztenssé vált⁶⁴. Mindkét gyógyszermolekula a RA terápiájában rendkívül gyakran alkalmazott bázisterápiás vegyületek csoportjába tartozik, amelyhez hozzá sorolható még a metotrexát, a kloroquin, az azathioprin, a ciklosporin A, valamint a glukokortikoidok is.

A metotrexát egy folát antagonist, amelynek hatásmechanizmusa a folát metabolizmus és purinbioszintézis kulcsenzimjeinek gátlásán alapul⁶⁵. Így alacsonyabb folát, valamint megemelkedett adenzinszint jelenik meg, amely apoptózishoz és/vagy gyulladáscsökkentő hatáshoz vezet^{66,67}. A szulfaszalazin a colitis ulcerosa, Crohn-betegség, valamint RA esetén is gyakran alkalmazott gyógyszer, melynek aktív metabolitja az 5-aminoszalicilsav (5-ASA). Az 5-ASA a prosztoglandin szintézisre, valamint a lipoxigenáz enzimen keresztül az arachidonsav metabolizmusra van hatással⁶⁸. Az antimaláriás gyógyszerek, mint a kloroquin és hidroxikloroquin alacsonyabb hatékonyságúak a fent említett szerekhez képest, viszont kevésbé toxikusak is. A ciklosporin A specifikusan a T-sejtek proliferációját gátolja⁶⁹.

A leflunomid az első, kifejezetten a RA kezelésére kifejlesztett bázisterápiás vegyület. Ez a molekula egy izoxazol származék, amely a mitogén-stimulált T- és B-limfociták proliferációját gátolja oly módon, hogy blokkolja a *de novo* UMP-szintézis kulcsenzimét, a dihydroorotát dehydrogenázt. Prodrug-nak tekinthető, hiszen a szervezetbe kerülve egy gyors reakció során a

biológiai hatásért felelős molekula, az A771726, vagy más néven teriflunomid képződik belőle (6.ábra)^{70,71,72}.



6. ábra: A leflunomidból az aktív metabolit, az A771726 képződik.

2.4.4 Az ABC transzporterek szerepe a gyógyszermolekulák ADME-Tox tulajdonságaiban

Az ABC transzporterek kölcsönhatás révén a szervezetbe bekerülő gyógyszermolekulák abszorpcióját, disztribúcióját, metabolizmusát és kiválasztását (ADME) is jelentősen befolyásolhatják.

A gyógyszerek szervezeten belüli metabolizmusa klasszikusan két részre osztható: a Fázis I-re, amely legtöbbször a molekula oxidációját jelenti, illetve a vízdékonyságot eredményező konjugációt magába foglaló Fázis II-re. Az utóbbi években azonban az is nyilvánvalóvá vált, hogy a transzporter membránfehérjék kulcsfontosságú szerepe miatt ez további két lépéssel egészíthető ki: a Fázis 0-ban a sejtmembránban lokalizálódó transzporterek befolyásolják a molekula intracelluláris térbe való bejutását, a Fázis III-ban pedig a detoxifikált drog eliminációját. Emiatt az ABC transzporterek az utóbbi években egyre inkább a gyógyszerfejlesztések látóterébe kerültek. Különböző *in vivo*, *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok segítségével próbálják nyomon követni a fejlesztés alatt álló molekulák szervezetbeni útját és sorsát^{73,11}.

Négy ABC transzporter jelentős a gyógyszerek intesztinális abszorpciója kapcsán; ezek az ABCB1, ABCC2, ABCC4 és az ABCG2, amelyek expressziós szintje a bélcsatorna különböző

szegmenseiben eltérő. A vékonybélben az ABCB1, az ABCC2 és az ABCG2 magasabb szintje figyelhető meg, amelyek jelentőségéről több tanulmány számol be^{74,75,76,77}.

A hatás kifejtéséhez a felszívódott molekuláknak el kell jutnia a célsejtekig, szövetekig. A központi idegrendszerbe (CNS) való bejutás a gyógyszerek nagy hányadánál követelmény, amelyet azonban a vér-agy-gát, valamint a vér-liquor-gát jelentősen limitál. Korábban úgy gondolták, hogy a lipofilicitás elegendő feltétele a CNS-be való bejutásnak, és nem tudták magyarázni azt a tényt, hogy bár számos drogmolekula lipofilicitása megfelelt a fent említett feltételnek, mégsem sikerült átjutni a BBB-en. Mára már nyilvánvalóvá vált az ABC transzporterek szerepe, hiszen az agykapillárisok endotél sejtjeinek apikális/lumináris membránjában lokalizálódó ABCB1 és ABCG2, valamint a choroid epitél sejtek bazolaterális membránjában lévő ABCC1 megvédi a központi idegrendszert a xenobiotikumoktól^{23,78}. Az ABCB1-nek az ABCC2-vel, valamint az ABCG2-vel együtt terhesség alatt rendkívül fontos szerepe van a magzat védelmében is a különböző toxinokkal és gyógyszerekkel szemben^{79,80}.

Mára elfogadott tény, hogy a béltraktus a metabolizmus első színtere. Azon molekulák, amelyeket pl. az ABCB1 kipumpál, újra felszívódhatnak az enterocitákba és ez az ismelt abszorpció megnöveli a gyógyszerek tartózkodási idejét a béltraktusban, így a metabolizmus lehetőségét is. Lin és munkatársai *in vivo* kísérletekkel bizonyították, hogy az ABCB1 és CYP3A4 szubsztrát indinavir metabolizmusa 6%-ról 34%-ra nőtt abban az esetben, ha a patkányokat ABCB1 és CYP3A4 expressziót indukáló dexametazonnal kezelték⁸¹. A különbség a szerzők szerint nem magyarázható kizárólag a CYP3A4 2,5-szeresre megnövekedett expressziójával, a szintén jelentősen megemelkedett expressziójú ABCB1 szerepe is feltételezhető.

A gyógyszer-molekulák kiválasztásának fő színtere a máj és a vese. A drogok a hepatocitákba és tubuláris epitél sejtekbe ezek bazolaterális membránján keresztül jutnak be, majd az apikális membránon keresztül távoznak passzív diffúzió vagy transzporterfehérjék révén.

Korábban már említett rendkívül fontos funkciója az ABC pumpáknak a szervezet toxikus vegyületekkel szembeni védelme. Az ABCC1-3 a hepatocitákban lokalizálódva különböző mérgező vegyületek, metabolitok glutation konjugátumait pumpálja ki. Szintén a hepatociták membránjában lokalizálódik az ABCB11 is, amelynek a különböző epesók eltávolítása a feladata. Számos gyógyszerről bizonyosodott be, hogy kompetitíven gátolják az ABCB11 általi epesó transzportot, megemelve ezzel a citotoxikus epesók intracelluláris szintjét, amely súlyos májkárosodáshoz vezet.

2.5 A dolgozatban részletesen vizsgált ABC transzporterek

2.5.1 ABCG2/MXR/BCRP

A 90-es évek végén lényegében egyidőben három különböző laboratórium is azonosította az ABCG2 molekulát: kettő drogszelektált sejtvonalból egy pedig humán cDNS könyvtárból, így a fehérje nevezéktana a kezdetekben nem volt egységes^{82,83,84}. Doyle és munkatársai rezisztens mellrák sejtvonalban azonosították, így BCRP-nek (breast cancer resistance protein) nevezték el, a verapamillal blokkolt ABCB1 funkciójú mitoxantronra rezisztens sejtvonalból származó fehérjének Allikments-ék az MXR (mitoxantrone resistance protein) nevet adták, míg Miyake és kutatócsoportja pedig ABCP-nek keresztelték el a placentában magasan expresszálandó proteint. Később azonban kiderült, hogy a cDNS könyvtárból származó fehérje a vad típusú, a másik kettő pedig hordoz egy olyan pontmutációt a 482-es pozícióban lévő aminosavnál, amely a szubsztrátspecifitást is befolyásolja. Ez a mutáció ráadásul a humán populációkban nem fordul elő, hanem a drogszelekció során keletkező szomatikus mutáció.

Az ABCG2 fehérje egy féltranszporter, amely homodimerizáció révén válik funkcióképes fehérjévé. Számos szövet apikális membránjában expresszálandó, különösen az intesztinális epitél sejtekben, a placentában, a vér-agy-gátban és a májban. Jelentős szerepe van a sejtek védelmében hipoxiás körülmények között, hiszen csökkenti a hem és/vagy porfirinek intracelluláris koncentrációját. Funkciója ugyan még mind a mai napig nem teljesen tisztázott, de tény, hogy a hematopoetikus őssejtek membránjában is jelentős mennyiségben kifejeződik^{85,86,87}. Abcg2 knockout egérkísérletek alapján eltérést tapasztaltak a két nem között, ugyanis a hímek májában magasabb szinten expresszálandó a fehérje, és ez jelentős különbséget okoz az Abcg2 szubsztrát gyógyszermolekulák farmakokinetikai viselkedésében⁸⁸. Az ABCG2-nek fontos szerepe van a különböző molekulák, toxinok, drogok anyatejbe való kiválasztásában is. Erre Jonker és munkatársai világítottak rá, miután ABCG2 expressziót észleltek a tejmirigyekben⁸⁹. Ugyancsak ők mutatták meg, hogy Abcg2^{-/-} állatokban egyes szulfát konjugátumok vizeleten keresztüli kiválasztása lényegesen alacsonyabb, mint a vad típusú állatokban⁹⁰.

Szubsztrátjai között találunk számos gyógyszermolekulát, illetve azok metabolitját ugyanúgy, mint toxint, élelmiszerekben megtalálható molekulákat, szulfatált hormon metabolitokat, klorofill metabolitot, fluoreszcens festéket stb.

2.5.2 ABCB11/sP-gp/BSEP

Az ABCB1 aminosavsorrendjével rendkívül nagy hasonlóságot mutató ABCB11 (bile salt export pump) transzportert 1998-ban klónozták először Gerloff és munkatársai⁹¹. A meglehetősen konzervált fehérje a hepatociták kanalikuláris membránjában lokalizálódva kulcsfontosságú szerepet játszik az epesók transzportjában. Aktív transzporterként – olyan más ABC pumpákkal együtt, mint az ABCC2, ABCB4 és az ABCG5/8 – az epébe pumpálja a szervezetből eltávolítandó molekulákat^{92,93,94}. Ezen transzporterek közül azonban egyedül az ABCB11 képes taurokolátot és glikokolátot transzportálni. A fehérje mutációjának következtében alakul ki a PFIC2 (progressive intrahepatic cholestasis) betegség, amely csökkent epesó kiválasztást eredményez. Számos gyógyszer-molekuláról derült ki, hogy gátolja az ABCB11-et, ezzel kolesztázist és májkárosodást okozva, hiszen az emberi szervezetben nincsen más mechanizmus, amely eltávolítaná a hepatocitákból az epesókat⁹⁵. Egy publikáció ugyan leírja, hogy az ABCC4 képes glutation jelenlétében epesó transzportra, azonban ez az eredmény más laborok által még nem került megerősítésre, így nem tudható, hogy a szinuszoidálisan elhelyezkedő ABCC4 képes-e legalább részben méregteleníteni a hepatocitákat⁹⁶. Az előzőekhez hasonlóan, a humán ABCC3-ról is megmutatták, hogy képes epesók transzportjára⁹⁷. Bár feltételezték, hogy a primer biliáris cirrózisban megemelkedett ABCC3 szint a kolesztázissal szembeni védekező funkciót szolgál, ennek megerősítésére még nem került sor⁹⁸. Emiatt rendkívül fontos a gyógyszerfejlesztés során az adott jelölt molekula ABCB11 transzporterrel való kölcsönhatásának vizsgálata is, ehhez azonban nagy áteresztőképességű, robosztus *in vitro* tesztrendszerekre van szükség.

Az ABCB11 esetében korábban az irodalomban ellentmondó eredmények voltak arra vonatkozólag, hogy a membrán kolesztarintartalma hogyan befolyásolja a transzporter működését. Hoda és munkatársai epekőre hajlamos (C57L/J) és rezisztens (AKR/J) egerek kanalikuláris membránját vizsgálva azt tapasztalták, hogy a C57L/J egerekben megemelkedett ABCB11 expresszió alacsonyabb taurokolát transzporttal jár, és ők ezt a megemelkedett kolesztarintartalommal magyarázták⁹⁹. Ugyanakkor tény, hogy a korábban már említett membrán kolesztarintartalomra érzékeny pumpák – úgy mint ABCB1, ABCC2, ABCG2 – szintén részt vesznek a különböző szervezetből eltávolítandó molekulák epén keresztüli eliminációjában.

2.6 Az ABC transzporterek vizsgálatára alkalmas tesztrendszerek

Számos *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* rendszer áll rendelkezésre az ABC transzporterek és a különböző gyógyszermolekulák, toxikus komponensek közötti kölcsönhatás vizsgálatára. A korai gyógyszerfejlesztés során elsősorban az *in vitro* módszerek kerülnek előtérbe, hiszen ezek alkalmasak arra, hogy viszonylag rövid idő alatt több száz, akár több ezer molekula adott transzporterrel való kölcsönhatását prediktálják. Az adott molekula szerkezeten belüli sorsáról, ADME tulajdonságairól, valamint ezekben a folyamatokban az ABC transzporterek szerepéről csak a jóval korlátozottabban kivitelezhető *in vivo* vizsgálatok adhatnak felvilágosítást. Az *in vivo* kísérletekhez hasonlóan az *ex vivo* modellek, úgymint az izolált perfúziós vékonybél, máj, vese vagy agy is fontos információt ad a gyógyszerek felszívódásáról, eloszlásáról, eliminációjáról és kiválasztásáról, ugyanakkor az állatkísérletekkel összehasonlítva jobban kontrollálhatóak^{100,101,102,11}.

2.6.1 *In vitro* módszerek

Alapjában véve az *in vitro* rendszerek két típusát különböztetjük meg: a vizsgálatok történhetnek az adott transzportert stabilan vagy tranziensen expresszáló sejtekkel, vagy pedig a kívánt ABC fehérjét kifejező sejtekből készült membrán preparátumokon. A módszer alapulhat az ATP hidrolízisének, vagy pedig a szubsztrát transzportjának a mérésén, ez esetben vizsgálhatjuk közvetlenül az adott molekula ABC fehérje általi transzportját vagy pedig egy jól ismert, ún. riporter szubsztrát transzportjára való hatását. Az előbbi módszer a gyógyszerjelölt és drog transzporter közötti kölcsönhatás jellemzésére, az utóbbi pedig az inhibítor molekulák detektálására alkalmas.

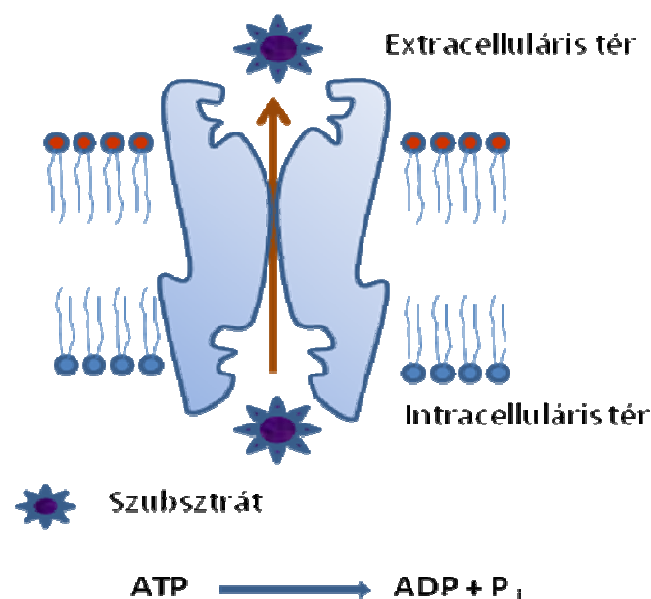
2.6.2 Membrán vezikula alapú vizsgálatok

ABC transzporterek vizsgálatára alkalmas membrán preparátum készíthető olyan sejtekből, melyek elegendően magas szinten expresszálják a vizsgálni kívánt fehérjét. A különböző drogszelektált, vagy transzfektált emlőssejtek relatíve alacsony fehérje expressziós szintjük miatt sok esetben nem felelnek meg ennek a kíváncsnak, habár mindenképp előnyük, hogy az expresszált transzporter

környezete nagyban hasonlít a fiziológiához. Széles körben elterjedt az ún. rekombináns bakulovírus expressziós rendszer használata, rovar eredetű Sf9 sejtek alkalmazásával, amely rendkívül magas fehérjeexpressziót eredményez.. Ugyanakkor mindenképp a rovarsejtes rendszer hátrányai közé sorolható, hogy a transzporter lipidkörnyezete eltér a fiziológiástól, és ez okozhat funkcióbeli különbségeket, illetve a glikoziláltsági fok sem egyezik meg az emlős rendszerekben tapasztaltakkal. Ez utóbbiról azonban több transzporter esetében kiderült, hogy nem befolyásolja a fehérje funkcióképességét^{103,104}.

ATPáz esszé

Az ATPáz esszé alapja az, hogy a transzporterfehérje a szubsztrátjának sejtől való kipumpálásához az ATP hidrolíziséből származó energiát használja fel. A hidrolízis során szervesen foszfát (Pi) szabadul fel, amely egyszerű kolorimetriás módszerrel detektálható (7.ábra). A membránvezikulában azonban a túlexpresszáltatott fehérje mellett más ATP-ázok is működnek, így szükséges ezek gátlása különböző specifikus gátlószerekkel. Az ABC transzporterekről általánosságban elmondható, hogy hatékonyan gátolhatók nátrium-ortovanadáttal, így a kísérletek során a totál, membránvezikulára jellemző összes ATP-áz aktivitásból elegendő a vanadát-érzékeny hányad meghatározása, amit vanadát-érzékeny alapaktivitásnak nevezünk¹⁰⁵.

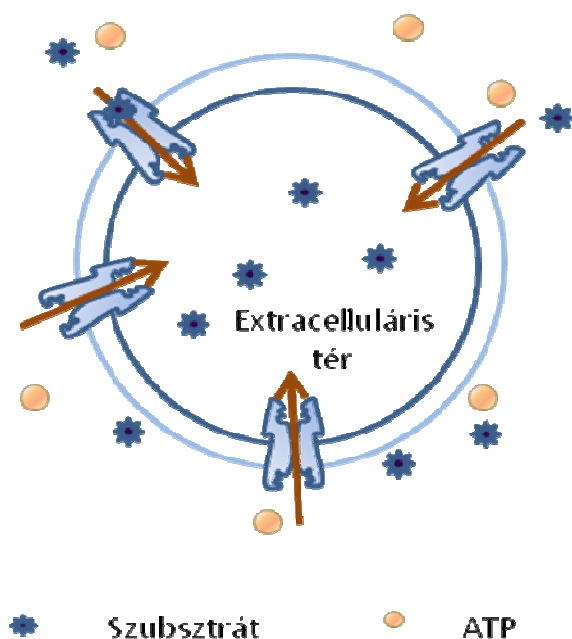


7.ábra: Az ATPáz esszé sematikus ábrája

Aktiválási teszt esetében a szubsztrát molekula stimulálja a vanadát-érzékeny alapaktivitást, a kapott dózisgörbéből pedig meghatározható az ún. EC_{50} , amely a maximum hatás 50%-ához tartozó koncentrációt jelenti. Az inhibítorok és a lassan transzportálódó szubsztrátok a gátlási tesztben detektálhatók. Ezen esetben a vizsgálni kívánt molekula hatását oly módon követik nyomon, hogy a transzportert egy ismert szubsztrát segítségével maximálisan aktiválják, és az ATP hidrolízist mérik növekvő inhibítor koncentrációknál. Ez a kölcsönhatás jellemezhető az ún. IC_{50} értékkel, amely a maximálisan felaktivált fehérje 50%-os gátlásához tartozó drogoncentrációt jelenti.

Vezikuláris transzport esszé (VT)

A membránvezikulák egy része ún. “inside-out” orientáltságú. Ezen kifordított vezikulák esetében a transzporter a molekulákat a vezikula belsejébe pumpálja; ez az alapja a vezikuláris transzport esszének (8.ábra). A vezikulák a bepumpált molekulákkal együtt megfelelő szűrési technikával elválaszthatók és ezt követően a szubsztrát molekula a jelölésétől függő módon detektálható; rendkívül széles körben elterjedt a különböző drogok fluoreszcens vagy radioaktív jelölése, érzékenyebbé téve ezzel a detektálást.



8.ábra: A vezikuláris transzport esszé sematikus ábrája

Abban az esetben, ha az adott szubsztrát transzportját mérjük, akkor direkt VT módszerről beszélünk. Indirekt a módszer azonban, ha a vizsgált molekula egy jól karakterizált szubsztrátra gyakorolt hatását vizsgáljuk. A direkt vezikuláris transzport esszé alkalmas egy drog-transzporter kölcsönhatás kinetikai karakterizálására, míg az indirekt VT-nél tapasztalt kölcsönhatás esetében nem tudjuk megmondani ennek természetét, azaz hogy szubsztrátról vagy inhibitorról van-e szó.

2.6.3 Sejtes vizsgálatok

ABC transzportert expresszáló sejtekben a fehérje csökkenti az adott szubsztrát akkumulációját, intracelluláris koncentrációját, valamint felgyorsítja a drog eliminációját a sejtből. Abban az esetben, ha a molekula citotoxikus, akkor a jelenlévő ABC transzporter csökkenti a sejt szerre/citosztatikumra való érzékenységet az anyasejtvonalhoz képest, megfelelő inhibitor jelenléte pedig felfüggeszti ezt a kialakult rezisztenciát. Ezeken a tényeken alapulnak azok a sejtes tesztrendszerek, amelyek segítségével a molekulák és az ABC transzporterek közötti kölcsönhatás vizsgálják. Emlős sejtvonalak mellett bakteriális, élesztő, valamint rovarsejteket is alkalmaznak. Az alacsony passzív permeabilitású molekulák vizsgálatához az ABC transzportereket uptake transzporterekkel együtt stabilan expresszáltatják ugyanabban a sejtben.

Citotoxicitási esszé

A citotoxicitási esszét rendkívül széles körben alkalmazzák az ABC transzporterek vizsgálatára is. A fehérjét stabilan kifejező sejtek az anyasejtvonalhoz képest magasabb toxikus molekula koncentráció jelenlétében is életképesek, így a két sejtvonal esetében jelentős IC_{50} -beli különbség figyelhető meg. A citotoxicitási esszénél az IC_{50} érték azt a citosztatikum koncentrációt jelenti, amelynél a sejtek 50%-a marad életképes. Ez a különbség azonban eltűnik abban az esetben, ha egy, az ABC pumpára specifikus gátlószert (revertáló ágenszt) alkalmaznak.

Festéktranszport esszé

A szubsztrátok intracelluláris akkumulációját a transzporter csökkenti, az inhibitorok vagy kölcsönhatók pedig visszaállítják azonos szintre a szülői sejtvonalhoz képest az ABC fehérjét

expresszáló sejtekben. Sok esetben fluoreszcens szubsztrátokat alkalmaznak. Más esetekben, mint pl. a Hoechst 33342 és a pheophorbid A az ABCG2 esetében, vagy a Calcein-AM az ABCB1 és ABCC1 esetén, egy nem fluoreszcens prekursor adnak a sejtekhez, amely a sejten belül válik fluoreszcenssé. Annak köszönhetően, hogy csak viszonylag kevés molekula fluoreszcens, ezt a módszert is elsősorban indirekt mérésekre alkalmazzák.

Transzcelluláris transzport esszé

A gyógyszermolekuláknak *in vivo* különböző farmakológiai barriereken – pl. az intesztinális epitél sejtek, a vér-agy-gát, hepatociták stb. – kell túljutniuk ahhoz, hogy eljussanak a célsejtekig, végül pedig hogy kiválasztódjanak a szervezetből. Ezt a transzcelluláris transzportot modellezi az ún. monolayer efflux esszé, amely során két folyadékkompartment közé egy szűrőfelületre kiültetett 100% konfluenciát elért ABC fehérjét expresszáló sejtréteg segítségével vizsgálják a transzportfolyamatokat.

2.6.4 *In vivo* módszerek

Míg az *in vitro* rendszerek alkalmasak arra, hogy viszonylag gyorsan információt adjanak arról, hogy egy adott gyógyszerjelölt kölcsönhat-e a vizsgált ABC transzporterrel, addig nem válaszolják meg azokat a kérdéseket, hogy fiziológias körülmények között a transzporterek hogyan befolyásolják a drog abszorpcióját, disztribúcióját, eliminációját és exkrécióját. Ennek tisztázása érdekében szükséges az *in vivo* vizsgálatok elvégzése, amelyre lehetőséget a transzgénikus, valamint mutáns állatok alkalmazása mellett specifikus gátlószer jelenlétében végrehajtott kísérletek adnak¹⁰⁶.

A korábban már említett Mdr1a (-/-) egér volt az első olyan genetikailag módosított állat, amely alkalmas volt az ABCB1 fiziológias funkciójának vizsgálatára⁴⁵. Az utóbbi másfél évtizedben számos olyan knock-out törzset hoztak létre, amelyeknél egyik vagy másik transzporter génjét, pl. az ABCB1-et, az ABCC1-et, ABCC3-at, vagy az ABCG2-t kiütötték, megakadályozva ezzel a fehérje kifejeződését. Az ezekkel az állatokkal végzett kísérletek nagyban hozzájárulnak az ABC transzporterek szervezetbeni funkciójának a megértéséhez, valamint kulcsfontosságú szerepet játszanak a gyógyszerkutatásban is^{107,108,109,110,111}.

Paul és munkatársai skót juhászkutyákat ivermectinnel kezelve figyelték meg azt, hogy az egyes egyedek eltérő érzékenységet mutatnak a gyógyszerrel szemben. Csak később, 2001-ben bizonyította Mealey és kutatócsoportja, hogy a megnövekedett ivermectin érzékenységet egy, az *mdr1* génben bekövetkező deléciós mutáció okozza^{112,113,114}. Az *mdr1a* génjét érintő mutációt figyelték meg a CF-1 egerek szubpopulációjában is, amely csökkent ABCB1 expressziót eredményez azokban a szövetekben, ahol az *Mdr1a* kifejeződése az elsődlegesen jellemző^{115,116}. Az Mrp2 fiziológias funkciójának tisztázásában, valamint a Dubin-Johnson szindróma megértésében fontos szerepet játszottak az olyan TR(-) és EHBR hyperbilirubinémiás patkányok, amelyekben nincsen Mrp2 expresszió^{117,118}.

Számos esetben alkalmaznak kombinált genetikai és kémiai knockout modelleket abból a célból, hogy vizsgálják egy gyógyszer farmakokinetikájában az adott transzporterek szerepét. Természetesen ezekben az esetekben kritikus tényező az inhibítor koncentrációja, valamint az, hogy kellőképpen szelektív legyen az adott transzporterre, és ez az ABC transzporterek esetében nem mindig egyszerű feladat.

3 Célkitűzések

1./ A bevezetőben említett terápiás területeken (daganatos betegségek, gyulladásos, -és autoimmunbetegségek) alkalmazott gyógyszermolekulák tesztelése a multidrogrezisztenciában szerepet játszó transzportereket kifejező MDR1-Sf9 (ABCB1-et), MRP1-Sf9 (ABCC1-et), valamint korábban a laboratóriumunkban kifejlesztett HT-BCRP-HAM-Sf9 (high-throughput) membránpreparátumok alkalmazásával abból a célból, hogy a korábban nem karakterizált kölcsönhatásokat leírjuk. Előzetes kísérleteink alapján specifikus kölcsönhatást figyeltünk meg az ABCG2 fehérje és a leflunomid molekula között. Célunk volt ezen kölcsönhatás természetének jellemzése különböző *in vitro* tesztrendszerek segítségével.

2./ Kíváncsiak voltunk arra, hogy a koleszterinnek az ABCG2-re való potencírozó hatása tapasztalható-e más olyan ABC transzporter esetében is, mint az ABCB11, amely az ABCG2-höz hasonlóan szintén a hepatociták koleszterinben gazdag kanalikuláris membránjában fejeződik ki. Célul tűztük ki, az így kifejlesztett BSEP-HAM-Sf9 (ABCB11-et expresszáló) membránok jellemzését, valamint korrelációs vizsgálatok végrehajtását a már rendelkezésre álló ABCB11 membránokkal vezikuláris transzport kísérletekben. Ezzel párhuzamosan ismert hepatotoxikus gyógyszerek fajok közötti affinitáskülönbségeinek vizsgálatát is el kívántuk végezni.

3./ Az egér Bsep-HAM-Sf9 (egér Abcb11-et kifejező) membrán ATPáz esszéjének adaptálásával egy széleskörűen alkalmazható nem radiokatív teszt kifejlesztése és optimalizálása is célunk volt. Ismert ABCB11 szubsztrátok segítségével validálni kívántuk az ATPáz esszében mért értékeket.

4 Anyagok és módszerek

Reagensek

A kísérletek során alkalmazott reagenseket az alábbi táblázat tartalmazza (1.táblázat)

Reagens neve	Reagens származási helye
[³ H]-Metotrexát	Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA),
[³ H]-Taurokolátot, [³ H]-LTC ₄	Perkin Elmer (Boston, MA, USA)
[¹⁴ C] –Glikokolát	Amersham Bioscience
³ H]-Taurokenodeoxykolát	Prof. Alan F Hofmann (University of
[³ H]-Glykokenodeoxycholát	California San Diego, CA, USA)
ABCG2 elleni ellenanyag	Abcam (Cambridge, UK)
ABCG2-t, ABCB1-et és az ABCC1-et	Prof. Sarkadi Balázs (National Medical Center,
expresszáló rekombináns bakulovírusok	Budapest, Hungary)
egér, patkány és humán ABCB11 elleni	Prof. Bruno Stieger (University of Zurich,
ellenanyag	Zurich, Switzerland)
RAMEB és a cholesterol@RAMEB	Cyclolab (Budapest, Hungary)
Ko134	Prof. GJ Koomen (National Cancer Institute,
	Amsterdam, Netherlands)
bovine gamma globulin	Fermentas UAB (Vilnius, Lithuania)
Többi vegyszer	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

1.táblázat: a kísérletek során alkalmazott reagensek és származási helyük

Sejtvonalak

A HEK293 sejtvonalat (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) és ennek ABCG2-t expresszáló változatát (HEK293-BCRP) 10%(v/v) hőinaktivált szérummal, 100 units/ml penicilinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 2 mM L-Glutaminnal kiegészített MIX MEM (Hank's F12 : DMEM ,1:1, Sigma) tápoldatban tartottuk 5% CO₂-ot tartalmazó 37°C-os inkubátorban¹¹⁹. 10% (v/v) hőinaktivált szérummal, 100 units/ml penicilinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 2 mM

L-Glutaminnal kiegészített Advanced RPMI 1640 (GIBCO) tápoldatot alkalmaztunk a PLB985, PLB985-BCRP (ABCG2-t expresszáló), K562-MDR (ABCB1-et expresszáló) és HL60-MRP (ABCC1-et expresszáló) sejtvonalak esetében, melyeket szintén 5% CO₂-ot tartalmazó 37°C-os inkubátorban szaporítottunk.

Membránvezikulák preparálása

A kísérletek során alkalmazott membránpreparátumok, úgymint MDR1-Sf9, MRP1-Sf9, BSEP-Sf9, patkány Bsep-Sf9, egér Bsep-Sf9, defBCRP-Sf9 és BCRP-HAM-Sf9 a Solvo Biotechnológiai Zrt-től származtak (Szeged, Hungary). Az Sf9 rovarsejteket az adott ABC transzportert tartalmazó rekombináns bakulovírussal fertőztük és ezekből preparáltunk membránt¹⁰⁵. A kapott membránpreparátumok fehérjetartalmát BCA módszer segítségével határoztuk meg (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

Western blot

Az ABCG2 esetén a fehérjék elválasztása 10%-os, az ABCB11 esetén pedig 7,5 %-os poliakrilamid denaturáló gélen történt. A szeparált fehérjéket 25 mM TRIS-t, 192 mM glicint és 15 % metanolt tartalmazó transzfer pufferben 1 órán keresztül 350 mA mellett polivinilidin difluoride membránra rögzítettük (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, U.S.A). Ezt követően a membránt 2 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoló pufferben (5 % zsírmentes tejpor, 0,5 % BSA, 0,05 % Tween 20, PBS-oldatban oldva) tartottuk. 2 órán át kezeltük a membránt az elsődleges ellenanyag, a monoklonális egér anti-ABCG2 BXP-21 1:1000-szer, valamint a nyúl anti-patkány Abcb11 1:500-szor blokkoló pufferben hígított oldatával, majd 3-szor 10 percen keresztül mostuk 0,05%- os Tween 20 tartalmú PBS oldattal. Ezután következett a másodlagos ellenanyag, az anti-egér IgG-HRP 1:5000-szer, valamint az anti-nyúl IgG-HRP 1:1000-szer 0,05%- os Tween 20 tartalmú PBS-ben hígított oldatával való inkubáció szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Ezt a korábban már említett módon mosási lépések követték, majd az immunoreaktív fehérjéket ECL detektáló rendszerrel vizualizáltuk (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). A minták ABCB11/Abcb11 tartalmának szemikvantitatív meghatározásához 15 µg összfehérjét vittünk fel és választottunk szét 7,5 %-os poliakrilamid gélen, majd Coomassie blue-val festettük. A kalibrációs görbéhez belső sztenderdként 140 kDa méretű borjú gamma globulint használtunk (1,25 – 5 µg /zseb). A kvantifikáláshoz ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) szoftvert alkalmaztunk.

Koleszterinkezelés

A membrán koleszterintöltését közvetlenül a membránpreparálás előtt végeztük oly módon, hogy a bakulovírussal fertőzött sejteket 30 percig 37 °C-on 1 mM cholesterol@RAMEB komplex jelenlétében inkubáltuk. Ezt a sejtek mosása követte Hank's oldatban (GIBCO), majd a preparálást a fent leírt módon folytattuk. Az eljárás szabadalmi oltalom alatt áll¹²⁰.

Membránvezikulák koleszterintartalmának meghatározása

A membrán koleszterintartalmának meghatározása a koleszterin-oxidáz módszeren alapul¹²¹. A reakció-elegy (500 mM MgCl₂, 500 mM Tris puffer, 10 mM DTT, 100 mg Triton X-100, pH 7,4) 10 µl-éhez 50 µl membránt adtunk és ezt inkubáltuk 10 µl 1mg/ml-es koleszterol-oxidáz enzim (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) jelenlétében 30 percig 37 °C-on. A reakciót 100 µl metanol/etanol oldattal (50% (v/v)) állítottuk le és továbbinkubáltuk 30 percig 0 °C-on. 5 perc 700 g-n való centrifugálás után a felülúszó 25 µl-jét C18 fordított fázisú kromatográfiás oszlopot tartalmazó HPLC-vel analizáltuk (1100 Series set, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Mozgó fázisként 0,3 ml/perc sebességgel áramló 1% (v/v) ecetsav/metanol elegyét használtuk. Az oxidált koleszterint 241 nm-en UV detektor segítségével detektáltuk. A koleszterin kvantitatív meghatározásához kalibrációs görbét alkalmaztunk.

ATPáz esszé

ATPáz esszét a Sarkadi és munkatársai által korábban leírt módon végeztük¹⁰⁵. Az ATPáz aktivitások meghatározására a PREDEASY BCRP-HAM-ATPase Kit-et, a PREDEASY defBCRP-HAM-ATPase Kit-et, a PREDEASY MDR1-ATPase Kit-et, a PREDEASY MRP1-ATPase Kit-et és a PREDEASY egér Bsep-HAM-ATPase Kit-et (SOLVO Biotechnology, Szeged, Hungary) alkalmaztuk. Mindegyik esszét a gyártó által meghatározott paraméterek, (µg membrán/lyuk, inkubációs idő és hőmérséklet) mellett végeztük.

Vezikuláris transzport esszé

Az "inside-out" vezikulákat is tartalmazó membránsuszpenziót (50 µg protein/lyuk) a megfelelő esszé elegyben – amely tartalmazta a transzportált szubsztrátot is – 4 mM ATP jelenlétében és hiányában 37 °C-on inkubáltuk. A reakciókat 200 µl hideg mosópufferrel állítottuk le. Ezt követően a reakcióelegyeket 1 µm pórusméretű B típusú üvegfiltert tartalmazó lemezekre szűrtük (Millipore,

Bedford, MA, USA) és 5x200 µl hideg mosó pufferrel mostuk. A filtereken maradt radioaktivitást folyadékszintillátor segítségével mértük az ATP-függő transzportot pedig az ATP-t tartalmazó és nem tartalmazó lyukakban mért értékek különbségéből számoltuk (Microbeta Trilux, Wallac Oy, Turku, Finland). Az 2.táblázat mutatja a különböző transzportkísérletek során alkalmazott esszé körülményeket.

	ABCG2 általi MTX transzport	ABCC1 általi LTC₄ transzport	ABCB11, patkány Abcb11 és egér Abcb11 által TC/GC/TCDC/GCDC transzport
Esszépuffer összetétele	7,5 mM MgCl ₂ 40 mM MOPS-Tris pH 7,0 70 mM KCl	7,5 mM MgCl ₂ 40 mM MOPS-Tris pH 7,0 70 mM KCl 2 mM GSH	1 M KNO ₃ 0,1 M Mg(NO ₃) ₂ 10 mM Hepes-Tris pH 7,4
Transzportált szubsztrát koncentrációja	100 µM	50 nM	2 µM
Reakcióidő	4 perc	1 perc	5 perc
Mosópuffer összetétele	40 mM MOPS-Tris pH 7.0 70 mM KCl	40 mM MOPS-Tris pH 7.0 70 mM KCl	100 mM Tris-HCl 1M KNO ₃

2.táblázat: A vezikuláris transzport kísérletek során alkalmazott kísérleti paraméterek

Festéktranszport esszék (Hoechst esszé és Calcein esszé)

A sejtenyészteshez használt tápfolyadék eltávolítása céljából Hank's puffekben mosott, mikrotiter lemezekre meghatározott számban kiosztott sejteket 1xHank's oldatban 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a specifikus inhibitor jelenlétében.

Hoechst esszé esetén ez 150 µl térfogatot jelentett, amelyhez az inkubációt követően 50 µl 1xHank's-ben oldott 50 µM Hoechst 33342 festéket adtunk elindítva ezzel a reakciót. A fluoreszcenciát spektrofotométer segítségével mértük 15 percig 30 másodpercenként kinetikus mérési módban (Fluoroskan Ascent Type 374), ahol az excitációs fény hullámhossza 350 nm, az emissziós fény pedig 460 nm volt. A maximális gátlást 300 nM Ko134 jelenlétében értük el.

A Calcein esszénél a sejteket 100 µl térfogatban inkubáltuk és további 100 µl 250 nM CalceinAM-et és BSA-t tartalmazó 1xHank's oldatot adtunk hozzá a reakció elindítása céljából. Ebben az esetben 60 µM verapamil segítségével kaptuk a maximális gátlást. A Calcein esszé esetében 485 nm hullámhosszú excitációs fényt és 538 nm hullámhosszú emissziós fényt alkalmaztunk, a mérést 8 percig végeztük 30 másodpercenként kinetikus mérési módban.

Meghatároztuk az inhibitor jelenlétében (R_{\max}) és távollétében (R_{alap}) kapott egyenesek meredekségét, valamint az egyes drogkoncentrációk esetében mért egyenesek meredekségét (R_{drog}). Az így kapott értékek segítségével a következő képlet felhasználásával meghatároztuk az adott koncentrációjú gyógyszermolekula által okozott gátlást:

$$\text{Gátlás(\%)} = \frac{R_{\text{drog}} - R_{\text{alap}}}{R_{\max} - R_{\text{alap}}} * 100 \quad (1)$$

Az egyes drogkoncentrációkhoz tartozó gátlási értékek ábrázolásával meghatároztuk az adott vegyület IC_{50} értékét.

Citotoxicitási esszé

A mikrotiter lemezekre 200 μ l tápfolyadékban meghatározott számú sejtet osztottunk ki, amelyeket 24 órán keresztül 37 °C-os 5% CO_2 -t tartalmazó inkubátorban tartottunk. Ezt követően a DMSO-ban oldott molekulákat tápfolyadékban előre hígítottuk és 50 μ l-ben adtuk a sejtszuszpenzióhoz. A kontrollok ebben az esetben csak DMSO-t tartalmazó tápfolyadékot kaptak. Az inkubáció 96 órán keresztül tartott 37 °C-os 5% CO_2 -t tartalmazó inkubátorban.

A HEK293 és HEK293-BCRP sejtvonalak esetében a kiindulási sejtsűrűség 2×10^4 sejt/ml, a PLB985 és PLB985-BCRP sejtvonalaknál pedig 5×10^4 sejt/ml volt.

A 96 óra elteltével a túlélő sejtek arányát MTS reakció segítségével határoztuk meg a gyártó által ajánlott kísérleti körülmények mellett (Promega, Madison, WI, USA). A kapott értékeket ábrázoltuk az alkalmazott drogkoncentrációk függvényében és meghatároztuk az IC_{50} értékeket.

Adatok kiértékelése

Az ATPáz esszé, a vezikuláris transzport esszé, valamint a festéktranszport esszék két, a citotoxicitási esszé pedig három párhuzamos mérési pontban készültek, ezeket átlagoltuk és szórást számoltunk.

ATPáz esszé esetében a vizsgált molekula által kiváltott hatást a következő egyenlet alapján számoltuk ki:

$$v = V_{\min} + \frac{V_{\max} - V_{\min}}{1 + 10^{(\log EC_{50} + [A]) \times n_H}} \quad (2)$$

ahol v = hatás (nmol Pi/mg protein/min), V_{\min} = minimális hatás, V_{\max} = maximális hatás, EC_{50} = az 50%-os hatáshoz tartozó drogkoncentráció, A = a tesztdrog koncentráció, n_H = a kooperativitást jellemző Hill-szám.

A VT esszé esetében a K_I értékek meghatározására a Cheng-Prusoff képletet használtuk:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (3)$$

ahol K_I = az inhibitor affinitását jellemző paraméter, IC_{50} = az 50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció, S = a szubsztrátkoncentráció, K_M = a szubsztrát affinitását jellemző paraméter¹²².

Citotoxicitási esszé esetében az IC_{50} értékeket – amelyek az 50%-os túléléshez tartozó drogkoncentrációt jelentik – a mért hatásgörbékből kaptuk meg.

A görbeillesztésekhez, valamint a kinetikai paraméterek számításához a PRISM 3.0 szoftvert használtuk (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Wilcoxon-próba és ANOVA segítségével vizsgáltuk a koleszterin hatását az ABCB11/Abcb11 általi epesótranszportra.

5 Eredmények

5.1 Új szubsztrát-transzporter kölcsönhatások detektálása és karakterizálása HT *in vitro* esszékkel

Munkánk során célul tűztük ki, hogy azon terápiás területekről, amelyeknél a kezelés hatékonyságát a multidrog rezisztencia jelensége befolyásolja, gyógyszermolekulákat választunk ki és három ABC transzporterrel – ABCB1, ABCC1, ABCG2 – való kölcsönhatásukat leírjuk és karakterizáljuk.

A kísérletek kivételéhez mindenképp olyan tesztrendszerekre volt szükség, amelyek segítségével megbízhatóan, viszonylag rövid idő alatt végre tudtuk hajtani a kísérleteket. Az ABCB1 és ABCC1 transzporter esetében rendelkezésre állt HT tesztelésre alkalmas Sf9 rendszer, az ABCG2 esetében azonban a korábban említett okok miatt a membránpreparátum erre nem volt alkalmas. Laboratóriumunkban ezzel párhuzamosan került kifejlesztésre a BCRP-HAM-Sf9 vezikulapreparátum, – amelyet egy korábbi dolgozatban ismertettünk – és már eleget tett a fent felsorolt kívánalmaknak.

Ezen molekulákat olyan nagy áteresztőképességű *in vitro* rendszerekben vizsgáltuk meg, mint az ATPáz esszé, vezikuláris transzport esszé, valamint festéktranszport esszé.

5.1.1 Az ABCG2 és leflunomid közötti specifikus kölcsönhatás karakterizálása

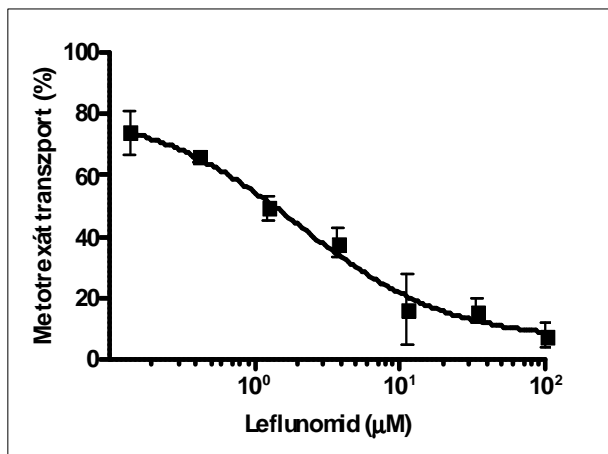
Kísérleti eredményeink egyértelműen rávilágítottak arra a tényre, hogy az ABCG2 és a leflunomid molekula között specifikus kölcsönhatás van. Korábban van der Heijden és munkatársai feltételeztek kölcsönhatást – humán T limfocitákat szulfaszalazin jelenlétében tenyésztve leflunomidra is rezisztens ABCG2-t expresszáló populációt figyeltek meg – de ezt egyáltalán nem karakterizálták.

Abból a célból, hogy jellemezzük a kölcsönhatást, a következő kísérleteket végeztük el a leflunomiddal, valamint az A771726 molekulával.

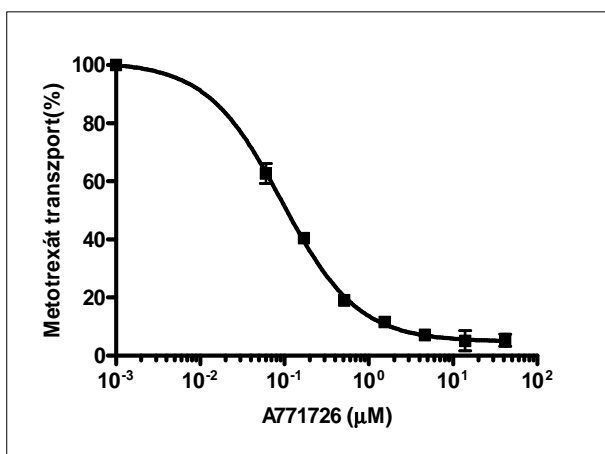
5.1.2 A leflunomid és az A771726 kölcsönhat az ABCG2-vel

Mind a leflunomid, mind pedig az A771726 koncentrációfüggően gátolja az ABCG2 mediált metotrexát transzportot a kifordított vezikulákba vezikuláris transzport kísérletekben (9.A,B ábra). Összehasonlítva a két molekulát megállapítható, hogy a leflunomidnak kisebb az affinitása, hiszen K_I értéke $1,86 \mu\text{M}$, míg az A771726 K_I értéke $0,093 \mu\text{M}$. A kísérletet különböző metotrexát koncentrációk mellett megismételve, a mért eredményeket Dixon-féle ábrázolásmódban megjelenítve elmondható, hogy a leflunomid és az A771726 molekula is kompetitíven gátolja az ABCG2 metotrexát transzportját (9.C,D ábra)¹²³.

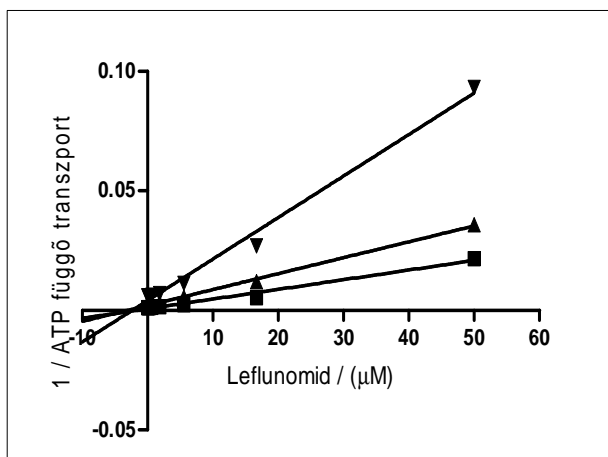
A



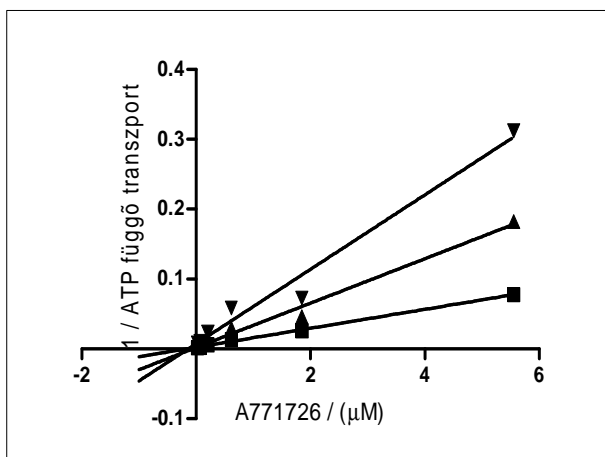
B



C

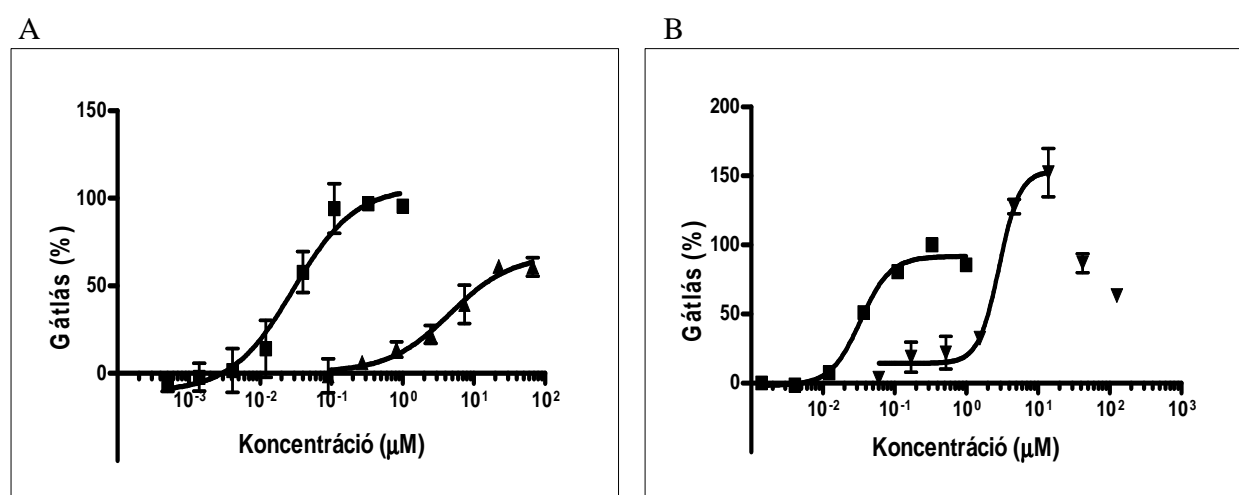


D



9.ábra: ABCG2-t tartalmazó vezikulák ATP függő metotrexát transzportja leflunomid (A) és A771726 (B) jelenlétében. Leflunomid (C) és A771726(D) kompetitív gátlásának Dixon-Webb féle ábrázolása 25 (▼), 50 (▲), és 100 (■) μM metotrexát jelenlétében ABCG2-t expresszáló vezikulákon.

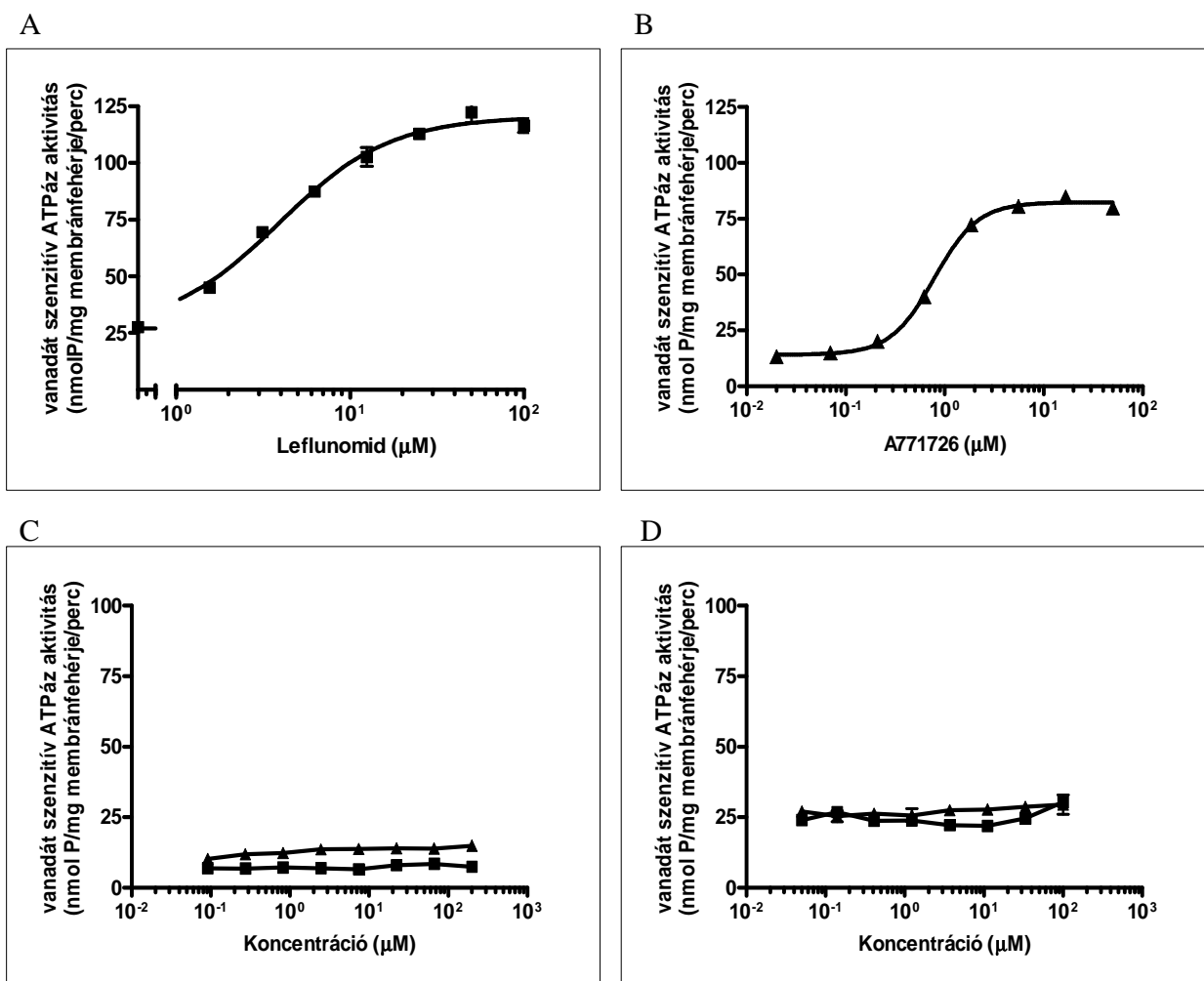
Hasonló eredményeket kaptunk a festéktranszport kísérletek során is, amelyet ABCG2-t expresszáló PLB985 sejtvonalon végeztünk. A leflunomid és a metabolitja is gátolja a Hoechst 33342 festék ABCG2 fehérje általi sejtből való kipumpálását. A 10.A,B ábra mutatja be a molekulák koncentrációfüggő gátlását az 1-es egyenletet alkalmazva. A kalkulált IC_{50} értékek hasonló koncentráció tartományba esnek; $4,53 \mu M$ a leflunomidra és $2,87 \mu M$ az A771726 molekulára vonatkozó IC_{50} paraméter, amelyet a kétfázisú görbe első szakaszát felhasználva kaptunk.



10.ábra: A leflunomid (A) és az A771726 (B) hatása a Hoechst 33342 festék ABCG2 általi kipumpálására PLB985-BCRP sejtekből. Mindkét diagrammon a (■) jelölés az ABCG2 specifikus Ko134 hatását mutatja.

5.1.3 A leflunomid és az A771726 az ABCG2 szubsztrátjai

A kölcsönhatás detektálása után kíváncsiak voltunk arra, hogy ezen molekulák szubsztrátjai vagy inhibitorai az ABCG2 transzporternek. Ebből a célból ATPáz esszéket végeztünk ABCG2-t expresszáló membránvezikulákon. Kísérleti eredményeink alapján elmondható, hogy mind a leflunomid, mind pedig az A771726 koncentrációfüggően stimulálja az ABCG2 vanadátfüggő ATPáz aktivitását (11.A,B ábra). Ez nem volt megfigyelhető sem a kontroll (defBCRP) (C), sem pedig az ABCB1-et expresszáló vezikulákon végzett kísérletek során még magas koncentrációban sem (D). A kalkulált EC_{50} értékek között itt is megfigyelhető az affinitásbeli különbség: a leflunomidra vonatkozó érték $3,93 \mu M$, az A771726-ra vonatkozó érték pedig $0,78 \mu M$ volt.



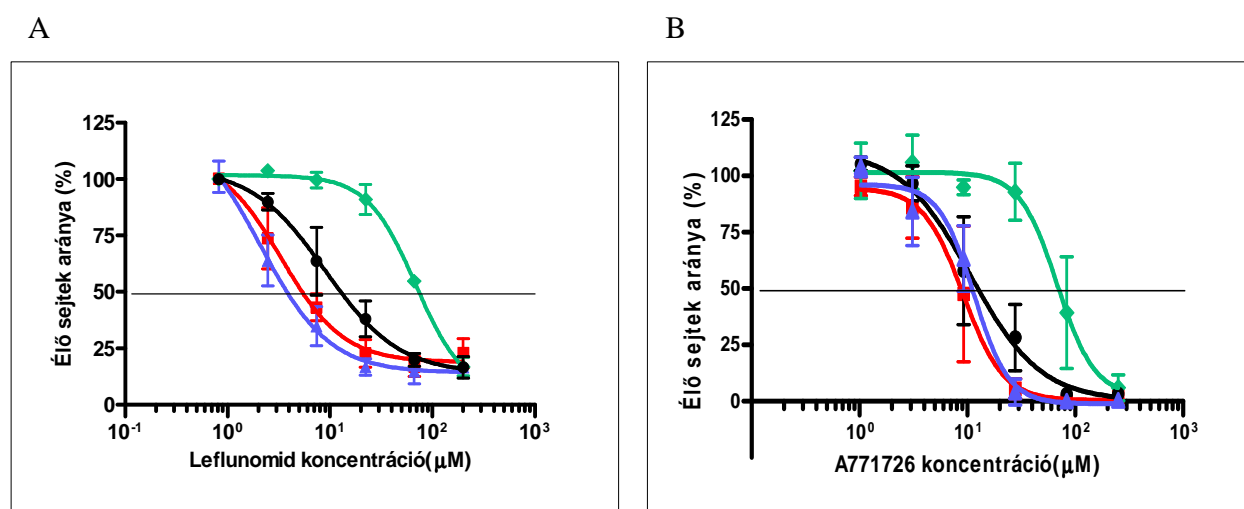
11.ábra: ABCG2-t tartalmazó membrán vanadát szenzitív ATPáz aktivitása leflunomid (A) és A771726 (B) jelenlétében. A leflunomid (■) és az A771726 (▲) hatása defBCRP-t (C) és ABCB1-et (D) tartalmazó mebránvezikulák vanadát érzékeny ATPáz aktivitására.

A 3.táblázat tartalmazza a vezikuláris transzport esszé, az ATPáz és a Hoechst esszé kinetikai paramétereit

	EC_{50} leflunomid (μM)	EC_{50} A771726 (μM)	$\text{IC}_{50}/\text{K}_i$ leflunomid (μM)	$\text{IC}_{50}/\text{K}_i$ A771726 (μM)
Vezikuláris transzport				
esszé-MTX	----	----	186	0,093
Hoechst esszé	----	----	4,53	2,87
ATPáz esszé	3,93	0,78	----	----

3.táblázat: A vezikuláris transzportban, az ATPázban és a Hoechst esszében mért adatokból számolt EC_{50} és $\text{IC}_{50}/\text{K}_i$ értékek.

A vizsgált két molekula esetében HEK293, valamint HEK293-BCRP sejtvonal alkalmazásával citotoxicitási esszében is sikerült alátámasztani a szubsztrát-jelleget. Abban az esetben ugyanis, ha egy vegyület szubsztrátja az ABCG2 transzporternek, akkor a fehérjét nagyobb mennyiségben expresszáló sejtvonal kevésbé érzékeny a drog egyre növekvő koncentrációjára, mint az anyasejtvonal. Ugyanakkor transzporter-specifikus inhibitor (1 μM Ko134) alkalmazásával ez a rezisztencia visszafordítható, így egyértelműen bizonyítható, hogy a rezisztencia kialakításáért az ABCG2 a felelős (12.A,B ábra).



12. ábra: a túlélés aránya a növekvő leflunomid (A) és A771726 (B) koncentráció mellett a HEK293-mock sejteken 1 μM Ko134 jelenlétében (\blacktriangle) és hiányában(\triangle), valamint HEK293-BCRP sejteken 1 μM Ko134 jelenlétében (\bullet) és hiányában(\diamond).

Az 4.táblázat tartalmazza az 1 μM Ko134 jelenlétében és hiányában a HEK293-mock és HEK293-BCRP sejtvonalon mért adatokból számolt IC_{50} értékeket leflunomidra és a metabolitjára.

IC_{50} (μM)	HEK293-mock	HEK293-mock +1 μM Ko134	HEK293-BCRP	HEK293-BCRP +1 μM Ko134
Leflunomid	3,34	2,09	68,8	8,98
A771726	9,16	11,49	68,03	10,72

4.táblázat: HEK293-mock és HEK293-BCRP sejteken leflunomid és A771726 növekvő koncentrációja mellett végzett citotoxicitási esszé IC_{50} értékei 1 μM Ko134 jelenlétében és hiányában.

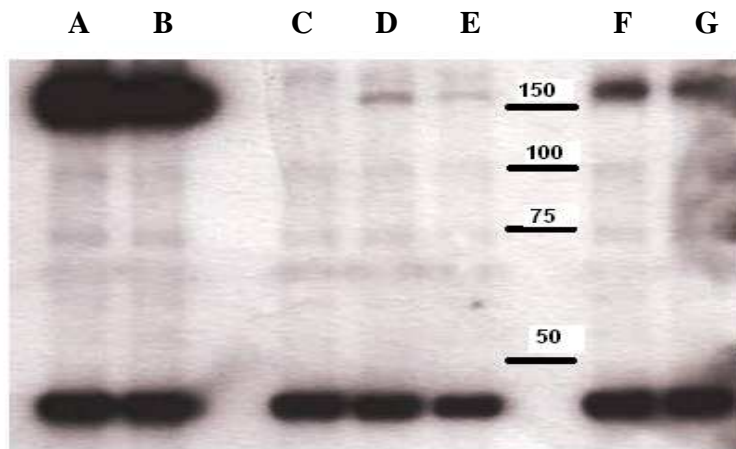
5.2 A koleszterin hatása az egér, a patkány és humán ABCB11 transzporter működésére

Az Sf9 expressziós rendszert rendkívül széleskörűen alkalmazzák különböző membránfehérjék, így ABC transzporterek kifejezésére. A különböző fajokból származó ABCB11/Abcb11 fehérjéket szintén gyakran expresszáltatják bakulovírussal fertőzött Sf9 rovarsejtekkel, az így kapott rendszerben mért K_M és IC_{50} illetve K_i értékek nagy mértékben hasonlítottak a hepatociták kanalikuláris membránjából készült preparátumában mért értékekhez^{124,125}. Számos ABC transzporterről, mint az ABCB1, ABCC2 és ABCG2 – amelyek az ABCB11-hez hasonlóan szintén a hepatociták kanalikuláris membránjában fejeződnek ki – mi és más laborok leírták már korábban, hogy koleszteringazdag régiókban lokalizálódnak és érzékenyek a membránkörnyezet koleszterintartalmára^{44,126,127}.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az ABCB11 fehérje működését hogyan befolyásolja a membránkörnyezet koleszterintartalma, ezért a következő kísérleteket végeztük el.

5.2.1 A koleszterin hatása az Sf9 sejtekből preparált membrán ABCB11/Abcb11 tartalmára

A hepatociták kanalikuláris membránja – amelyben az ABCB11 lokalizálódik – koleszterinben meglehetősen gazdag, ugyanakkor az expresszióhoz alkalmazott Sf9 rovarsajtek koleszterintartalma elmarad az emlős sejtekéhez képest. Abban az esetben azonban, ha az Sf9 sejtek membránját a vezikulapreparációt megelőzően koleszterinnel töltjük fel a fiziológiához jobban hasonlító lipidösszetételű rendszert kapunk. Az ABCB11/Abcb11 transzportert tartalmazó bakulovírussal fertőzött Sf9 sejtet kezeltünk koleszterin@RAMEB komplexszel, amelynek hatására a preparált membrán koleszterintartalma megközelítőleg 3-4-szer magasabb (0,16 $\mu\text{mol/mg}$ fehérje) lett. Míg a humán ABCB11 és az egér ortológ expressziós szintje közel azonos volt (2,6 μg /15 μg összfehérje és 2,2 μg /15 μg összfehérje), addig a patkány Abcb11 ezeknél jóval kisebb mennyiségben fejeződött ki (1,3 μg /15 μg összfehérje). A 13.ábra szemlélteti, hogy a membrán koleszterintartalmának változása nem volt jelentős hatással a kifejezni kívánt fehérje expressziós szintjére és méretére.

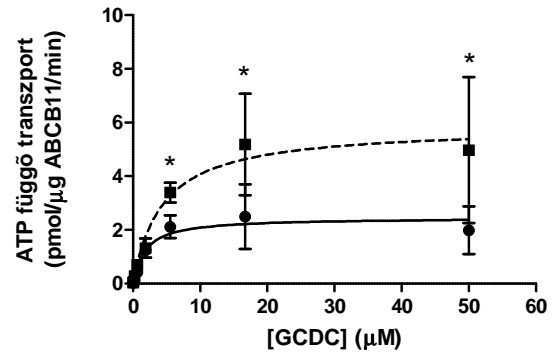
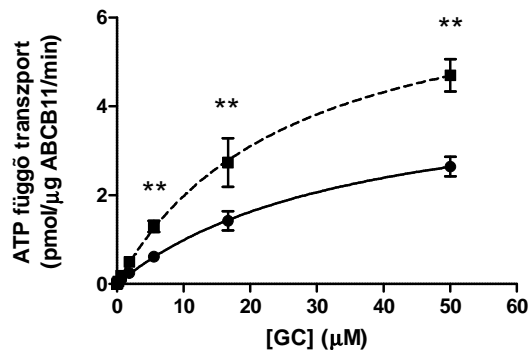
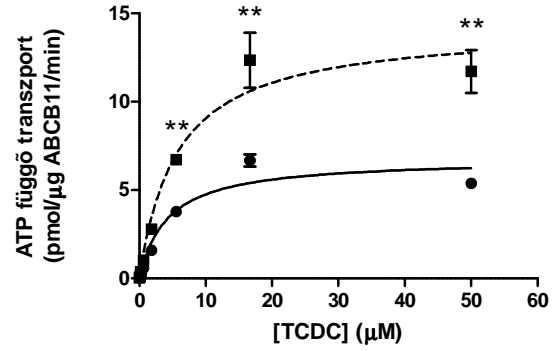
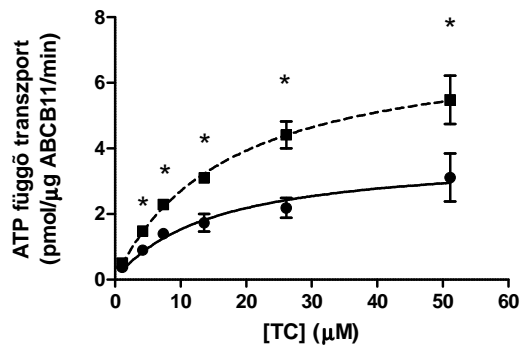


13.ábra: A koleszterin feltöltés hatása az ABCB11/Abcb11 transzporterek expressziós szintjére és méretére. A:BSEP-Sf9, B:BSEP-HAM-Sf9, C: β -gal-Sf9, D:patkány Bsep-Sf9, E:patkány Bsep-HAM-Sf9, F:egér Bsep-Sf9, G:egér Bsep-HAM-Sf9. Az 50 kDa alatti méretű az α -aktin.

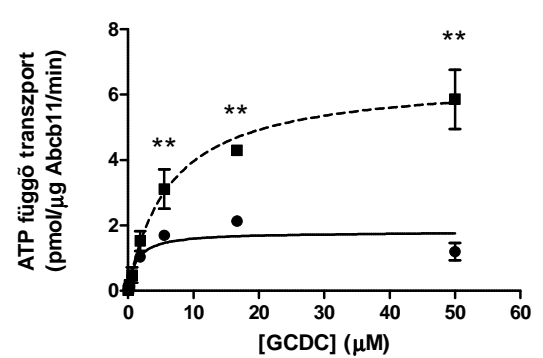
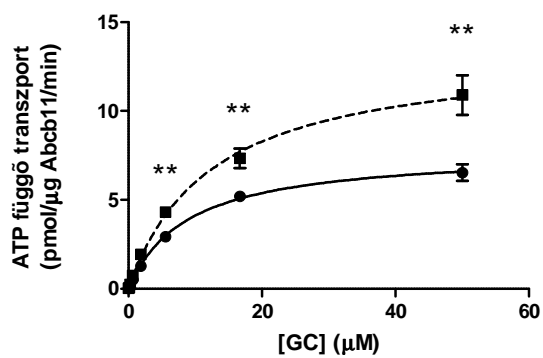
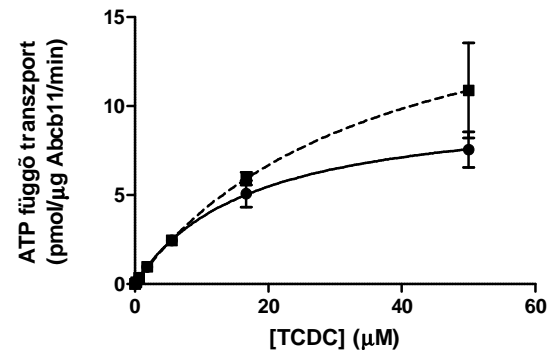
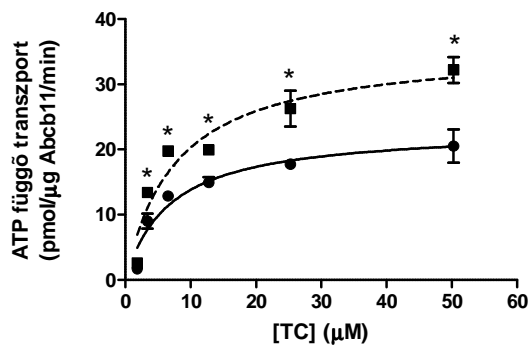
5.2.2 A koleszterin hatása az ABCB11/Abcb11 fehérjék működésére

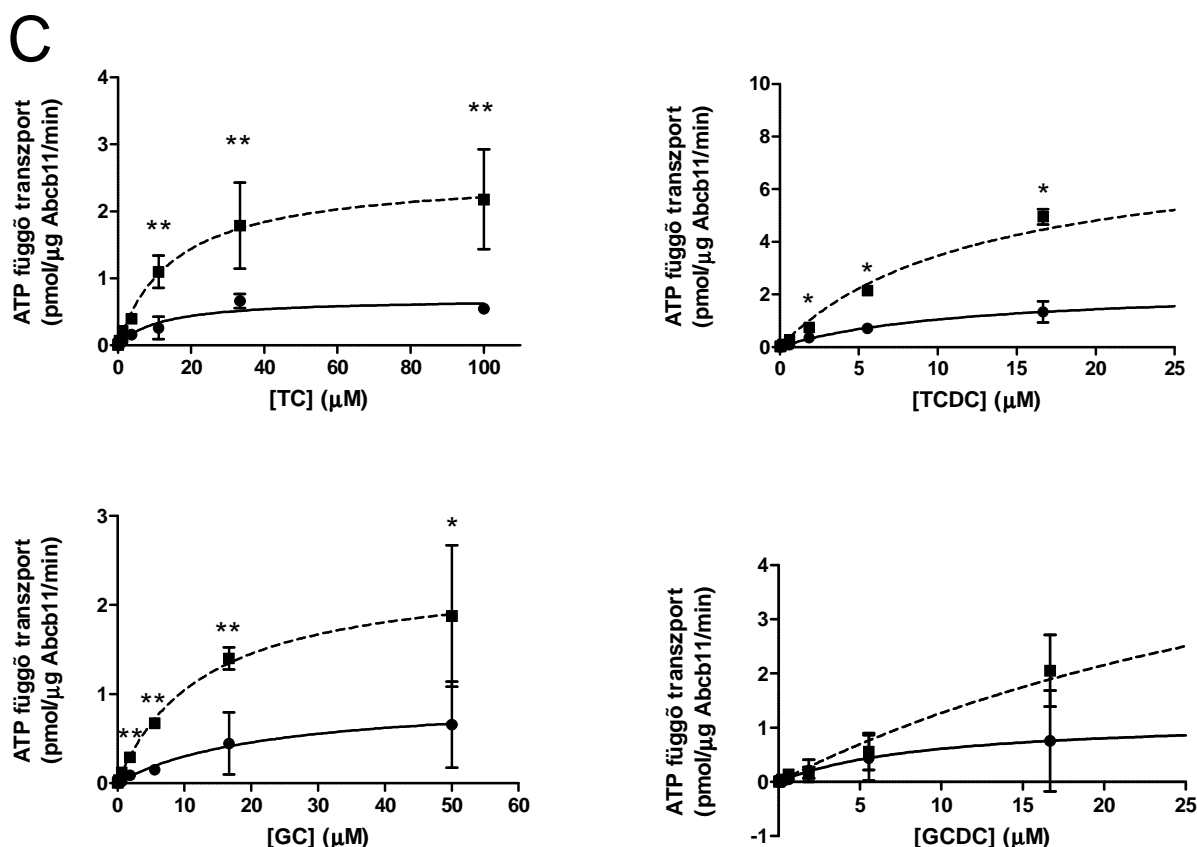
Kísérleteink során a membránkörnyezet megemelkedett koleszterintartalmának hatását a három különböző fajból származó ABCB11/Abcb11 fehérje négy különböző epesó: TC, TCDC, GC és GCDC transzportján keresztül vizsgáltuk. Mind a négy epesó transzportjáról elmondható, hogy a Michaelis-Menten kinetikát követi. Az Sf9 sejt membránjának koleszterinnel való feltöltése magasabb V_{\max} értékeket eredményezett, a transzportnövekedés pedig majd minden esetben statisztikailag is szignifikáns volt (14.A,B,C ábra).

A



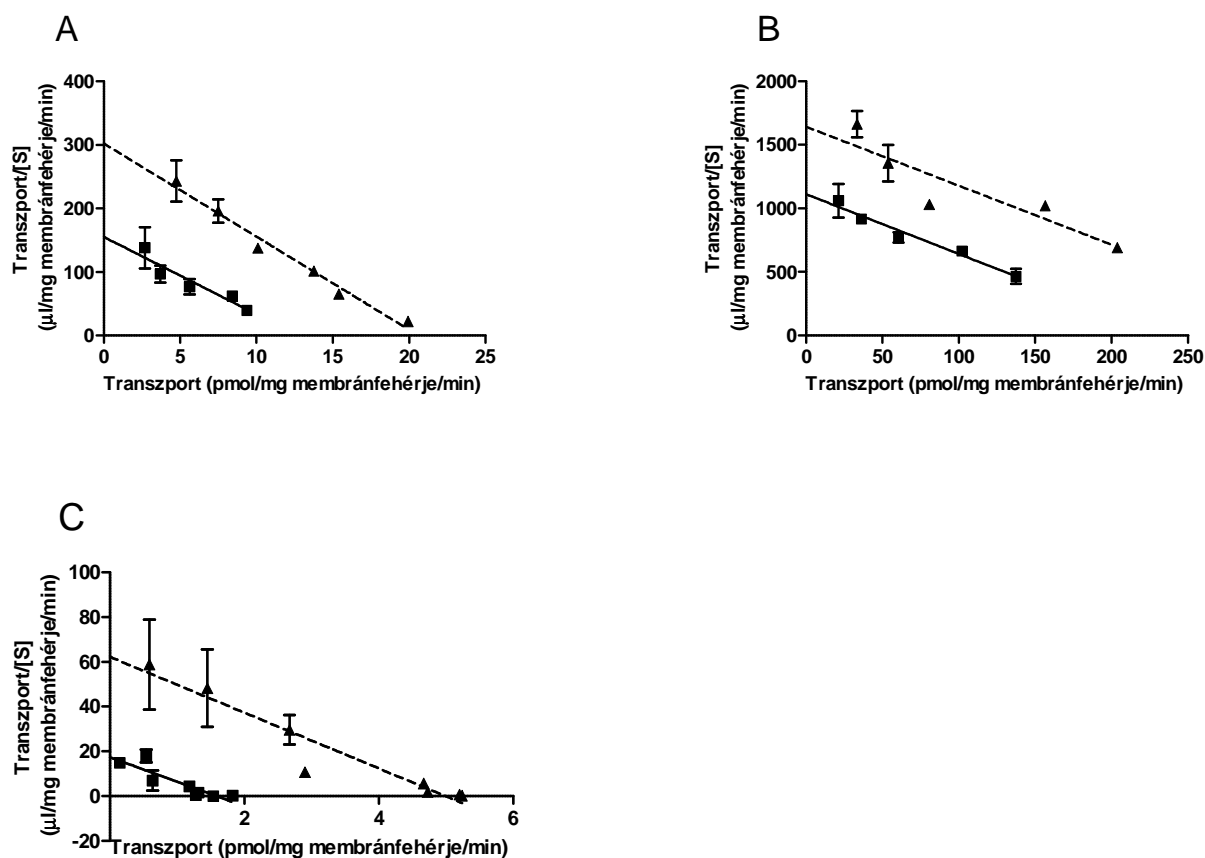
B





14.ábra: A kontroll (●) és koleszterinkezelt (■) humán (A), egér (B) és patkány (C) Abcb11 fehérje általi epesótranszport. A transzport értékek a preparátumok ABCB11/Abcb11 tartalmára lettek korrigálva. A statisztikai analízist a Wilcoxon-próbával végeztük, * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$.

Az észlelt K_M változás kisebb mértékű volt, tendenciájának kiderítése céljából a TC transzportot kiválasztva a sebességi értékeket Eadie-Hofstee-féle linearizálásnak vetettük alá. Az egyenesek negatív meredeksége határozza meg a K_M értékét, amelyek között szignifikáns eltérést – a kontroll és HAM membránt összevetve – nem tapasztaltunk (15.ábra).



15.ábra: Az ABCB11/Abcb11 fehérje általi TC transzport értékek Eadie-Hofstee- féle linearizálása. A:humán ABCB11, B:egér Abcb11, C:patkány Abcb11

A kísérleteink során kapott és ezekből számított K_M , valamint V_{\max}/K_M értékeket az 5.táblázat tartalmazza.

	humán ABCB11				egér Abcb11				patkány Abcb11			
	Kontroll		HAM		Kontroll		HAM		Kontroll		HAM	
	K_M μM	V_{max}/K_M $\mu l/\mu g/min$	K_M μM	V_{max}/K_M $\mu l/\mu g/min$	K_M μM	V_{max}/K_M $\mu l/\mu g/min$	K_M μM	V_{max}/K_M $\mu l/\mu g/min$	K_M μM	V_{max}/K_M $\mu l/\mu g/min$	K_M μM	V_{max}/K_M $\mu l/\mu g/min$
T C	15,0 ± 3,6	0,25 ± 0,02	17,0 ± 1,1	0,42 ± 0,01	6,7 ± 2,1	3,41 ± 0,23	7,6 ± 2,8	4,70 ± 0,43	11,7 ± 5,5	0,06 ± 0,00	15,3 ± 1,3	0,16 ± 0,0
G C	35,5 ± 1,1	0,12 ± 0,01	25,9 ± 0,9	0,27 ± 0,04	8,84 ± 0,3	0,88 ± 0,08	12,3 ± 1,0	1,08 ± 0,4	22,1 ± 3,8	0,04 ± 0,00	12,8 ± 0,9	0,18 ± 0,0
T C D C	4,2 ± 1,7	1,59 ± 0,3	5,7 ± 1,5	2,49 ± 0,04	17,1 ± 0,3	0,59 ± 0,08	36,5 ± 0,2	0,51 ± 0,07	11,8 ± 1,3	0,19 ± 0,06	12,6 + 2,3	0,62 ± 0,1
G C D C	1,7 ± 0,6	1,38 ± 0,03	4,3 ± 1	1,36 ± 0,13	1,89 ± 0,7	1,42 ± 0,2	4,75 ± 0,7	1,36 ± 0,3	15,9 ± 2,0	0,12 ± 0,08	45,9 ± 10,2	0,15 ± 0,07

5.táblázat: A kontroll és a HAM egér, patkány és humán ABCB11 fehérje általi TC, GC, TCDC, GCDC transzportok K_M és V_{max}/K_M értékei.

Vizsgáltuk a koleszterintartalomváltozás olyan hatását is, hogy milyen módon befolyásolja a különböző fajból származó ABCB11/Abcb11 transzporterek különböző epesókhoz való affinitását. Eltolódás egyedül a patkány Abcb11 esetében volt megfigyelhető kismértékben, ugyanis koleszterinfeltöltés hatására a GC, GCDC és TCDC V_{max}/K_M értékei közelítettek egymáshoz. A táblázat alapján az is elmondható, hogy a membránkörnyezet koleszterinkoncentrációjának megemelkedése leginkább a patkány Abcb11-re, legkevésbé pedig a humán ABCB11-re volt potencirozó hatással.

5.2.3 Kolesztatikus gyógyszerek hatása az ABCB11/Abcb11-HAM általi TC, GC, TCDC, GCDC transzportra

A következőkben megvizsgáltunk három kiválasztott hepatotoxikus gyógyszer hatását ABCB11/Abcb11-HAM általi TC, GC, TCDC, GCDC transzportra. A kísérletek során kapott maximális gátlásokat és IC_{50} értékeket a 6.táblázat foglalja össze.

	TC	GC	TCDC	GCDC
	IC ₅₀ (μM) (maximális gátlás %)			
	humán ABCB11			
Glibenklamid	14,7 (100)	18,8 (100)	15,8 (100)	7,6 (87)
Ciklosporin A	18,9 (100)	0,93 (100)	0,94 (100)	9,4 (100)
Troglitazon	9,5 (100)	16 (100)	27,6 (100)	24,4 (100)
	egér Abcb11			
Glibenklamid	150 (100)	95,5 (100)	109 (86)	153 (90)
Ciklosporin A	2,05 (85)	1,16 (100)	7,17 (60)	1,87 (71)
Troglitazon	40,4 (100)	56,3 (100)	63,4 (85)	42,4 (100)
	patkány Abcb11			
Glibenklamid	26,1 (100)	23,1 (100)	15,5 (100)	22,5 (100)
Ciklosporin A	0,89 (100)	2,28 (100)	0,09 (100)	23,85 (100)
Troglitazon	27,5 (100)	48,9 (100)	42,3 (100)	34,5 (100)

6.táblázat: A glibenklamid, a ciklosporin A és a troglitazon hatása az ABCB11/Abcb11-HAM általi epesó (TC, GC, TCDC, GCDC) transzportokra.

Az eredmények alapján elmondható, hogy habár a glibenklamid és troglitazon IC₅₀ értékei egy fajon belül nem nagyon mutattak különbségeket, jelentős – akár nagyságrendi – eltérések figyelhetők meg a fajok között. Mindkét gyógyszer esetében a humán transzporter rendelkezik a legnagyobb affinitással és az egér a legkisebbel. A ciklosporin A által kifejtett gátlás IC₅₀ értékei már egy fajon belül is mutatnak eltéréseket, nemcsak a fajok között. A ciklosporin A a humán ABCB11 általi TC transzportot akár húszszoros IC₅₀-nel gátolja, összevetve a GC, vagy TCDC transzporttal. Hasonló nagy diverzitás figyelhető meg a patkány Abcb11 esetében is.

5.2.4 Kolesztatikus gyógyszerek hatása a humán ABCB11 és ABCB11-HAM általi TC transzportra

A továbbiakban kilenc olyan gyógyszer hatását vizsgáltuk, amelyek közismerten kolesztázist okoznak. Kíváncsiak voltunk arra, hogy befolyásolja-e a membrán koleszterintartalma az ABCB11 fehérje molekulákhoz való affinitását. A 7.táblázat tartalmazza a molekulák által az epesó transzportra kifejtett maximális gátlás mértékét és a kapott IC₅₀ értékeket.

	ABCB11-CTRL	ABCB11-HAM
	IC ₅₀ (μM)	
Troglitazon	8,4	9,5
Ciklosporin A	2,0	18,9
Glibenklamid	11,3	14,7
Valinomicin	0,7	1,0
Vinblasztin	57,3	62,0
Rifampicin	10,5	18,8
Clofazimin	2,3	5,4
Reszerpin	2,8	4,9
Etinilösztadiol	15,7	17,1

7.táblázat: Koleszterikus gyógyszerek hatása az ABCB11/ABCB11-HAM általi TC transzportra.

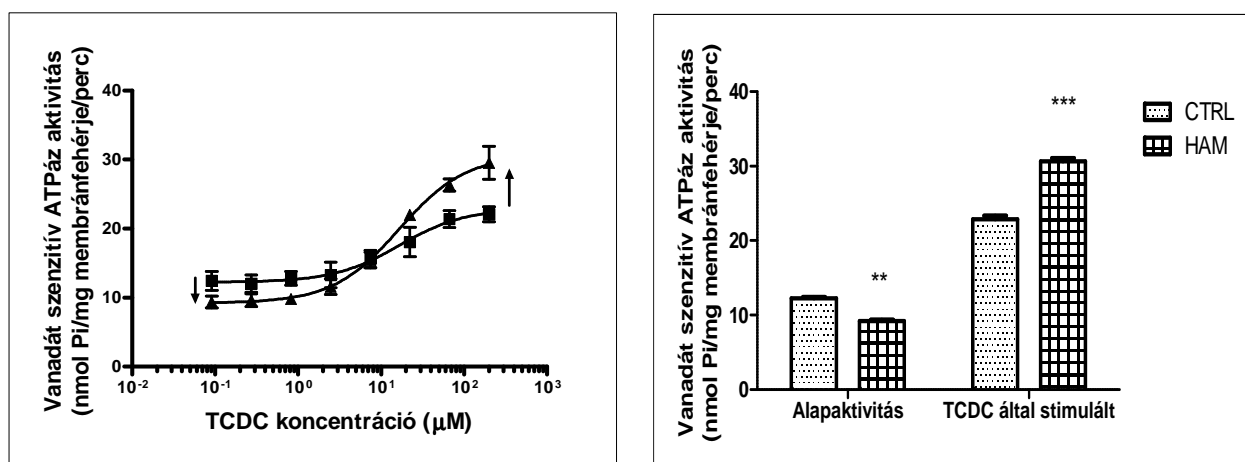
A 7.táblázat alapján elmondható, hogy a membránkörnyezet lipidtartalma nem befolyásolja az ABCB11 fehérje affinitását a vizsgált gyógyszerekhez. Ez alól egyedül a ciklosporin A jelent kivételt, hiszen majd 10-szeres különbség mutatkozik a kapott IC₅₀ értékekben (2 μM a control és 18,9 μM a HAM vezikula esetén).

5.3 Az egér Abcb11-HAM membrán ATPáz esszéjének kifejlesztése

Noe és munkatársai 2001-ben megjelent publikációjukban az egér Abcb11 transzportert Sf9 sejtekben expresszáltatták és tanulmányozták¹²⁸. Ezt már megelőzte a patkány Abcb11, de csak később, 2002-ben követte a humán ABCB11 karakterizálása^{124,129}. Mindhárom ortológ esetben sikerült különböző epesók transzportját vezikuláris transzport kísérletekben mérni, ugyanakkor ATPáz esszében az Sf9 rendszerek alkalmazásával csak az egér Abcb11 esetében. Ennek az az oka, hogy esetünkben csak ez a transzporter rendelkezik olyan magas V_{max} értékkel az egyes epesók esetében, amely már detektálható ATPáz esszében. Az említett kísérleti módszer igen nagy jelentőségű, mert amellet, hogy kellőképpen robosztus és nagy áteresztőképességű, alkalmas a kölcsönhatásokon túl a szubsztrátok detektálására is.

5.3.1 A sejtmembrán koleszterintartalom növekedésének hatása az egér Abcb11 transzporter ATPáz működésére

A TCDC és az egér Abcb11 transzporter kölcsönhatását ATPáz esszében tanulmányozva megállapítható, hogy a membrán koleszterintartalmának növelése az esszé robosztusságát növelte, hiszen a csökkent alapaktivitás mellett magasabb maximális ATPáz aktivitást mértünk nmol Pi/mg membránfehérje/perc mértékegységben, és ez a változás statisztikailag is szignifikáns volt (16.ábra).

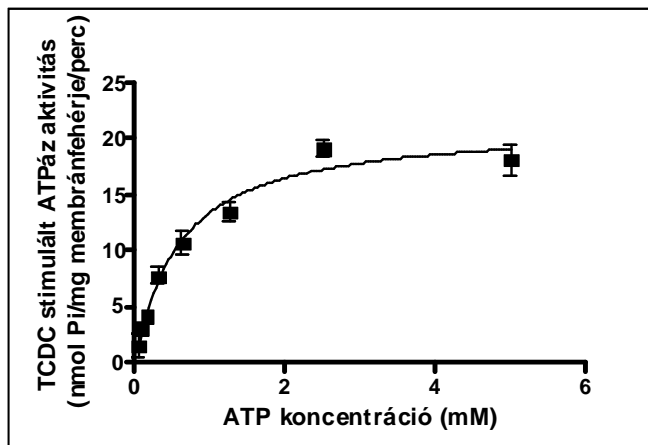


16.ábra: Az egér Abcb11-et (■) és egér Abcb11-HAM-et (▲) tartalmazó membránvezikulák vanadátszenzitív ATPáz aktivitása növekvő TCDC koncentráció mellett. A statisztikai analízist ANOVA segítségével végeztük, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Az eredmények szerint közel a duplájára (1,7-ről 3,2-re) emelkedett a membránpreparátum $100 \mu\text{M}$ TCDC-tal való aktiválhatósága, ami az esszé jobb alkalmazhatóságát eredményezi.

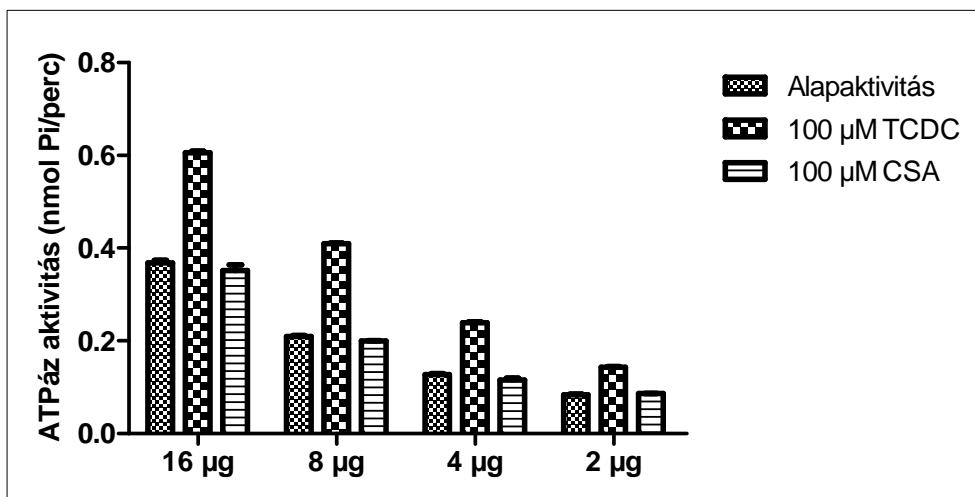
5.3.2 Az egér Abcb11-HAM transzporter ATPáz esszéjének optimalizálása

Az egér Abcb11-HAM transzporter TCDC stimulált ATPáz aktivitása függ az ATP koncentrációjától (17.ábra). A telítési görbe maximális transzportsebessége $21 \text{ nmol Pi/mg membránfehérje/perc}$, az ATP-re vonatkozó K_M értéke pedig $0,6 \mu\text{M}$. A maximális ATPáz aktivitást 2 mM ATP koncentráció mellett közelítettük meg, így a további kísérletek során ezt az ATP koncentrációt alkalmaztuk.



17.ábra: Az egér Abcb11-HAM transzportert tartalmazó vezikulák ATPáz aktivitása az ATP koncentrációjának függvényében.

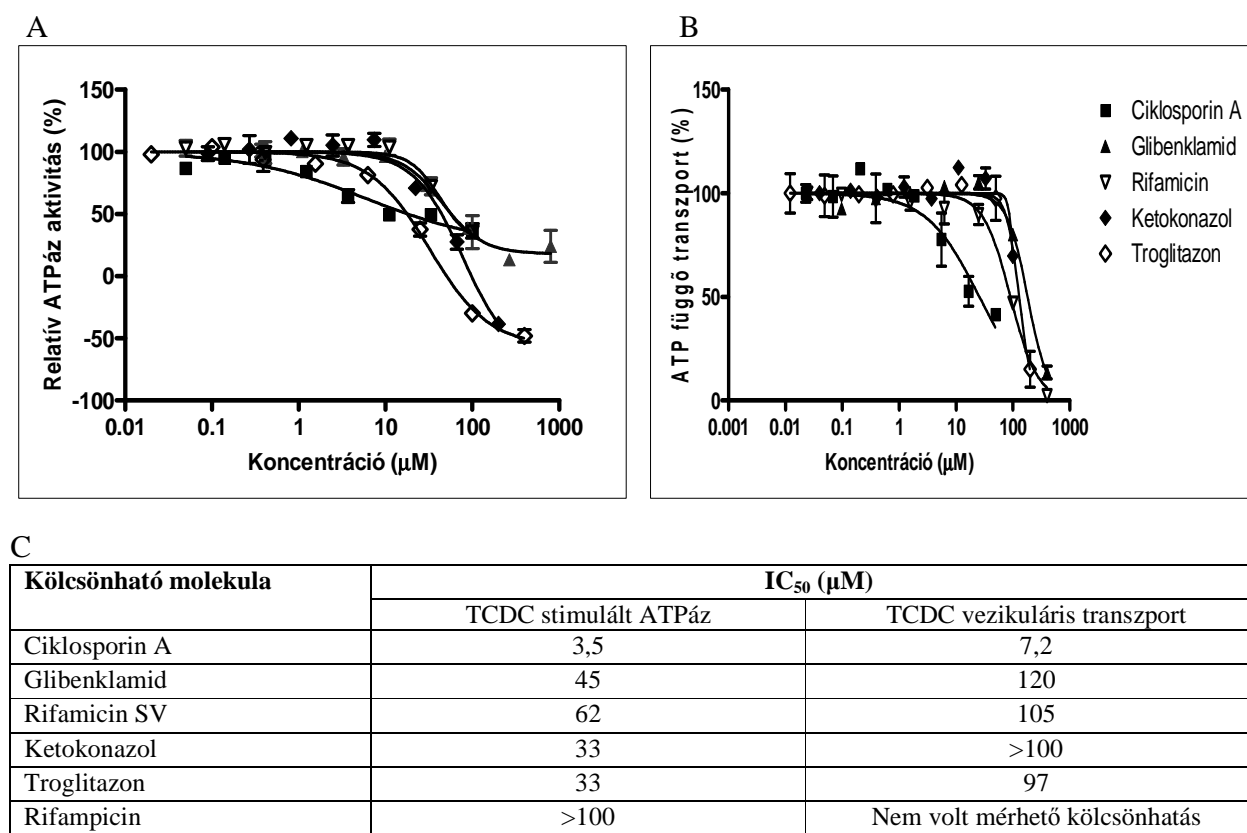
Ezt követően optimalizáltuk az esszé kivitelezéséhez szükséges egér Abcb11-HAM transzportert tartalmazó membrán mennyiségét és az inkubációs időt. Figyelembe véve azt is, hogy a mérés során mindvégig a foszfát kalibrációs görbe lineáris szakaszán mérjünk, optimális inkubációs időnek a 15 perc mutatkozott. Különböző fehérjemennyiségek mellett mértük az alap, 100 μ M TCDC által stimulált és 100 μ M ciklosporin A által gátolt ATPáz aktivitásokat 15 perc inkubálással (18.ábra). A fent említett szempontot is szem előtt tartva továbbiakban a kísérleteket 8 μ g membránmennyiség mellett kiviteleztük.



18.ábra: Az egér Abcb11-HAM transzporter alap, 100 μ M TCDC által stimulált és 100 μ M ciklosporin A (CSA) által gátolt ATPáz aktivitásainak változása az összfehérjemennyiség függvényében.

5.3.3 Az egér Abcb11-HAM transzporterrel kölcsönható molekulák detektálása ATPáz és VT esszében

Abból a célból, hogy validáljuk az egér Abcb11-HAM ATPáz esszét, kiválasztottunk egy molekulaszettet, amelyet az említett esszé mellett TCDC vezikuláris transzport kísérletekben is megvizsgáltunk és összehasonlítottuk az így kapott kinetikai paramétereket (19.A,B,C ábra). Ezekről a gyógyszerekről az irodalomban leírták, hogy hepatotoxikusak, amelyet az ABCB11 fehérjével való kölcsönhatásuk okoz, így alkalmazásuk kolesztázishoz vezethet^{124,125,130}.



19.ábra: A vizsgált molekulák hatása az egér Abcb11-HAM TCDC transzportra ATPáz esszében (A) és vezikuláris transzport esszében (B), valamint a kapott IC₅₀ értékek összehasonlítása (C).

A mért IC₅₀ értékek egymással viszonylag jól korrelálnak, bár elmondható, hogy a az egér Abcb11-HAM ATPáz esszében kapott paraméterek 2-3-szor kisebbek a VT-ben mértékhez képest (17.C táblázat). A rifampicin esetében ATPáz esszében rendkívül magas – >100 μM – IC₅₀ értéket kaptunk, így ez a kölcsönhatás vezikuláris transzport kísérletben már nem is volt detektálható. A két mérési módszer eredményei egymást erősítik, mivel az affinitások sorrendje azonos mindkét rendszerben.

6 Megbeszélés

Új szubsztrát-transzporter kölcsönhatások detektálása és karakterizálása HT *in vitro* esszékkel

A 70-es évekre az onkológusok számára egyre nyilvánvalóbbá vált az a tény, hogy az újabb és újabb, kezdetben rendkívül hatékony kemoterápiás szerek ellenére egyes tumortípusokkal szemben továbbra is tehetetlenek, hiszen ezek egy része már “öröklötten” rezisztens adott gyógyszerekre, míg más részük a terápia során válik azzá. A kezelés hatékonyságát még az is nehezíti, hogy ez a rezisztencia multidrog-jellegű, azaz kialakulása után egymástól teljesen eltérő szerkezetű gyógyszerek is hatástalanná válnak. A multidrog rezisztenciáért felelős, membránban elhelyezkedő pumpák – amelyek az ABC transzporterek családjába tartoznak – szerepét, szerkezetét és a funkcióját az utóbbi harminc évben sikerült felderíteni. Az is kiderült, hogy három ABC fehérje, az ABCB1/Pg-p/MDR1, az ABCC1/MRP1 és az ABCG2/BCRP/MXR/ABCP felelős a fent említett jelenség kialakulásáért, amely nemcsak a daganatos betegségek kezelése esetén merülhet fel, hanem pl. olyan krónikus gyulladásos,- és autoimmunbetegségek esetében is, ahol a gyógyszerek viszonylag hosszantartó alkalmazása szükséges.

Kísérleteink során egy meglehetősen specifikus, mindeddig ismeretlen interakciót figyeltünk meg az ABCG2 és a rheumatoid arthritis terápiájában gyakran alkalmazott leflunomid között. Különböző membránalapú és egész sejt alapú *in vitro* esszék segítségével sikerült karakterizálni az ABCG2 és leflunomid, valamint a metabolitja, az A771726 között megfigyelt kölcsönhatást. Azt tapasztaltuk, hogy a fent említett molekulák az ABCG2 fehérje szubsztrátjai, ugyanis aktiválják az ABCG2-t ATPáz esszében, kompetitíven gátolják az ABCG2 általi metotrexát transzportot, valamint az ABCG2-nek köszönhetően kevésbé toxikusak a transzportert expresszáló sejtvonalra.

Az a tény, hogy van der Heijden és munkatársai RA betegek izületeiből származó endotél sejteiben és makrofágjaiban ABCG2 kifejeződést tapasztaltak azt sugallja, hogy az ABCG2-nek fontos szerepe lehet a gyulladásos folyamatokban. Ezt az expressziót a szerzők inkább gyulladásfüggőnek, mint gyógyszerfüggőnek találták¹³¹. Korábbi adatokból ismert, hogy az ABCG2 részt vesz olyan bázisterápiás vegyületek abszorpciójában és eliminációjában, mint a szulfaszalazin, vagy a metotrexát^{132,133,134,135}.

A metotrexát egy ismert ABCG2 szubsztrát, amelyet gyakran alkalmaznak vezikuláris transzport kísérletekben¹³⁶. Ez a gátláson alapuló *in vitro* esszé metotrexát-drog kölcsönhatások kimutatására alkalmas. A leflunomid és a metabolitja is koncentrációfüggően gátolták az ABCG2 általi metotrexát transzportot a kifordított BCRP-HAM-Sf9 vezikulákba. A két molekula affinitása azonban eltérő, hiszen míg a leflunomid esetén 1,86 μM , addig az A771726 esetében 0,093 μM K_i értéket számoltunk. A Dixon-féle ábrázolással azt is sikerült megállapítani, hogy ez a gátlás kompetitív típusú.

A kinetikai paraméterekben, az EC_{50} értékekben észlelt eltérés az ATPáz esszé esetében is megfigyelhető volt (3,93 μM és 0,78 μM). Mindkét molekula koncentrációfüggően stimulálta az ABCG2 ATPáz aktivitását, amely szubsztrát természetére utalhat.

A Hoechst 33342 egy membránpermeabilis festék, amely kiváló szubsztrátja az ABCG2-nek. A festéket alkalmazó esszé, amelyet a transzportert expresszáló sejteken végeztünk, alkalmas a tesztanyagok és a transzporter közötti kölcsönhatás nyomonkövetésére. A leflunomid és a metabolitja is gátolta az ABCG2 általi Hoechst 33342 transzportot, azonos nagyságrendbe eső IC_{50} értékekkel (4,53 μM és 2,87 μM).

Citotoxicitási esszét végeztünk a transzportert expresszáló és üres vektorral transzfektált HEK293 sejteken abból a célból, hogy igazoljuk ezen molekulák nem csupán kölcsönhatói, hanem szubsztrátjai is az ABCG2 fehérjének. Az ABCG2-t expresszáló sejtek 20,6- szor, valamint 7,5-ször voltak rezisztensebbek a leflunomidra és az A771726-ra a HEK293-mock sejteknél. Mivel ez a rezisztencia ABCG2 specifikus inhibitor segítségével visszafordítható volt, sikerült bizonyítani, hogy ez folyamat az ABCG2-nek köszönhető oly módon, hogy a transzporter csökkenti a drogok intracelluláris koncentrációját.

A különböző esszék kinetikai paramétereit megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a két molekula közötti nagyságrendi eltérés csak a membránvezikula alapú rendszerek esetében volt megfigyelhető. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a Hoechst esszé, valamint a citotoxicitási esszé esetében – ahol az ABCG2-vel való interakcióhoz szükség van arra, hogy a molekulák bejussanak a sejtekbe – jelentős különbség van a passzív permeabilitásokban. A leflunomid metabolitja egy plusz hidroxil csoporttal rendelkező nyitott gyűrűs molekula, amely feltehetőleg alacsonyabb permeabilitással rendelkezik.

A leflunomid egy viszonylag új bázisterápiás vegyületnek számít, amelyet monoterápiában, valamint más bázisterápiás szerekekkel és nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentőkkel kombinálva is alkalmaznak a RA terápájában^{137,138,139,140,141}. Több tanulmány is beszámol arról hogy, ha egy

hosszabb, már kevésbé hatékony metotrexát-kezelést leflunomiddal egészítenek ki, akkor a beteg állapotának javulása figyelhető meg^{72,142}. Ez kísérleti eredményeink szerint magyarázható a vizsgált molekulák, valamint a metotrexát között fellépő kompetitív inhibícióval, amely az egyik vagy másik gyógyszer intracelluláris koncentrációjának emelkedését eredményezi. Ezen eredmények képezhetik az alapját a RA-terápia egy újfajta megközelítésének, amelyben kezelés mellett fontos lehet az ABCG2 transzporter gátlása is specifikus inhibítorral vagy akár más bázisterápiás vegyülettel is. Feltételezzük, hogy az ABCG2 fehérje fontos szerepet játszik az ABCG2 szubsztrát bázisterápiás gyógyszerekkel szembeni rezisztenciában. Ez a hipotézisünk azóta megerősítést nyert, hiszen van der Heijden és munkatársai megmutatták, hogy a metotrexátra illetve leflunomidra rezisztens betegek szinoviális makrofágjaiban az ABCG2 szintje szignifikánsabban magasabb, mint a terápiára jól reagáló betegek esetében¹⁴³.

A közeljövőre azt tervezzük, hogy a fent említett terápiás területekről kiválasztott gyógyszerek és a releváns ABC transzporterek közötti különböző, általunk kifejlesztett és alkalmazott *in vitro* esszéekben megfigyelt kölcsönhatást kinetikai szempontból jellemezzük. Az így kapott paraméterek, úgymint EC₅₀ és IC₅₀ értékek segítségével egy kisebb adatbázist szeretnénk létrehozni, illetve az irodalomban korábban még nem leírt interakciókat jellemezni. Ezen adatok alapját képezhetik az egyénre szabott terápiának, hiszen ha a beteg MDR-ABC transzporter profilja ismert, olyan gyógyszer kerülhet alkalmazásra, amely esetén nem lép fel MDR-jelenség, és így jelentősen javulhat a terápia hatékonysága. A hematológiai tumorok esetében rendelkezésre áll egy olyan tesztrendszer, amely a Calcein-esszén alapulva a funkcionális ABCB1 és ABCC1 mennyiségét határozza meg, és jelenleg dolgozunk a kit ABCG2 szint mérésére alkalmas bővítésén.

A membrán koleszterintartalmának hatása az egér, patkány és humán ABCB11 működésére

Az egér Abcb11 transzporter 1321 aminosavból felépülő fehérje, amelynek molekulatömege 160 kDa, az Sf9 rendszert alkalmazva, azonban a rovarsejtek csökkent glikozilációs képessége miatt egy 130 kDa tömegű, funkcionális fehérje fejeződik ki^{144,91,145}. Korábbi kísérletek rávilágítottak arra a tényre, hogy az Sf9 expressziós rendszert alkalmazva patkány Abcb11 esetén alacsonyabb transzportsebességek érhetők el, mintha izolált kanalikuláris plazmamembrán vezikulákat alkalmaznánk⁹¹. Bizonyítást nyert, hogy a csökkent glikolizáció valószínű nem befolyásolja az

ABCG2 transzporter működését, viszont a membrán koleszterintartalma igen, hiszen az is kiderült erről a fehérjéről, hogy koleszteringazdag raftokban és kaveolákban lokalizálódik^{39,44}.

Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az egér, patkány és humán ABCB11 is érzékeny a membrán koleszterintartalmára, hiszen megemelkedett transzportsebességeket mértünk abban az esetben, ha megnöveltük az Sf9 sejtek plazmamembránjának koleszterin tartalmát. Ez a potencírozó hatás a V_{max} növekedésén túl jelentős mértékben nem befolyásolta az epesó transzportok K_M értékét, azaz nem volt hatással az affinitásra. A koleszterin ezen hatása az ABCB11/Abcb11 fehérjékre nem teljesen tisztázott. Feltételezésünk szerint allosztérikus modulátorként hat a fehérjére, vagy pedig a membrán fluiditását változtatja meg. A legújabb publikációk alátámasztják ezen eredményeinket, ugyanis Paulusma és munkatársai ATP8B1 hiányos egér kanalikuláris membránját vizsgálva - amelynél a koleszterintartalom jelentősen lecsökkent - azt tapasztalták, hogy az Abcb11 fehérje általi transzport kb. negyede a vad típus esetében tapasztaltnak. A kísérleteket a koleszterin *in vitro* kivonásával elvégezve is hasonló eredményeket kaptak¹⁴⁶. Saját munkánkkal párhuzamosan Ismaier és munkatársai által az is bizonyítást nyert, hogy az ABCB11 a kanalikuláris membrán koleszterinben gazdag raft régiókban lokalizálódik¹⁴⁷.

Az ABCB11 fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a kanalikuláris epesó transzportban, szabályozza a hepatocitákban, valamint gyakorlatilag az egész szervezetben az epesó koncentrációját. A hepatotoxicitás manapság az egyik legkritikusabb pontja a gyógyszerfejlesztésnek. Az esetek egy részében a toxicitás oka az, hogy az ABCB11 drogok általi gátlása miatt az epesók nemkívánt mennyiségben halmozódnak fel a hepatocitákban.

Számos molekuláról már a preklinikai kísérletek során kiderül, hogy májkárosodást okoz, ugyanakkor sok esetben – a molekulák közel 50%-ánál – erre csak a Fázis I klinikai kísérletei során derül fény. Ez többek között azzal magyarázható, hogy az adott molekula a preklinikai vizsgálatokhoz alkalmazott kísérleti állatban és az emberi szervezetben eltérő mértékben okoz hepatotoxicitást^{148,149}. Ennek oka abban keresendő, hogy a kísérleti állatokként alkalmazott rágcsálókban a hidroxiláció révén az epesók tovább metabolizálódhatnak, és ezzel azt eredményezik, hogy kevésbé toxikus tetrahidroxi-epesavak képződnek, másrészt a rágcsálókban más transzporterek révén alternatív mechanizmus is létezik az epesavak eliminációjára. Míg az emberi szervezetben az ABCB11 hiánya vagy blokkolása rendkívül súlyos kolesztázishoz vezet addig az *Abcb11* -/- rágcsáló az epesók majd 30%-át képes továbbra is szekretálni^{150,151}. Különbség figyelhető meg abban is, hogy az emberi szervezetben az epesók főleg glicin, míg a rágcsálókban elsősorban taurin konjugátumai fordulnak elő. Ezek ismeretében rendkívül fontos a fajok közötti

vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása, elemzése. Vizsgálataink során a kiválasztott, bizonyítottan hepatotoxikus gyógyszerek epesó transzportra gyakorolt hatásaiknál az affinitásban jelentős különbségeket tapasztaltunk. A glibenklamid és a troglitazon esetében a humán fehérje rendelkezett a legnagyobb affinitással, legkisebbel pedig az egér ortológ. A ciklosporin A kapcsán mért IC₅₀ értékek között nemcsak a fajok között, hanem egy fajon belül a különböző epesók között is jelentős különbségek voltak. Az általunk kapott eredményeket összehasonlítva az irodalomban található TC transzportra vonatkozó adatokkal elmondható, hogy a glibenklamid és CSA esetében kétszeres különbség van a humán ABCB11-nél és 3-6-szoros a patkánynál, ugyanakkor a drogok affinitási sorrendje – CsA<troglitazon~glibenklamid – megegyezik¹³⁰.

Annak érdekében, hogy a megváltoztatott lipidkörnyezetű membránban kifejezett fehérjékkel mért kísérletek során kapott eredményeket validáljuk, kiválasztottunk egy kilenc kolesztatikus molekulából álló szettet, amelyeket kontroll és HAM humán ABCB11-en is megmértünk. A molekulák IC₅₀ értékeit figyelembe véve nem tapasztaltunk különbséget a kontroll és koleszterinnel feltöltött vezikulák között, egy kivételtől eltekintve: ez a gyógyszer a ciklosporin A, amely esetében a különbség közel tízszeres volt. Ez a molekula úgy tűnik nemcsak a különböző epesókra, hanem a membrán koleszterintartalmára is meglehetősen érzékeny.

Az egér Abcb11-HAM ATPáz esszé kifejlesztése

Kísérleteink során sikerült megmutatni, hogy az egér Abcb11 transzporter is érzékeny a membrán koleszterintartalmára. TCDC-ot szubsztrátként alkalmazva az Sf9 membrán koleszterinfeltöltésének hatására ATPáz esszében nagyobb ATPáz aktivitást, vezikuláris transzport esszében pedig magasabb transzport értéket mértünk. A megemelkedett koleszterinszint ATPáz esszében az alapaktivitás szignifikáns csökkenésével járt, amely így egy jobb jel/zaj arányú esszét eredményezett.

Az egér Abcb11-HAM vezikulák ATPáz aktivitása idő, hőmérséklet, valamint ATP függőnek bizonyult. Az esszé körülményeinek optimalizálása után egy kiválasztott molekulaszett segítségével – amely vegyületekről az irodalomban leírták, hogy hepatotoxicitást okoznak – a mért IC₅₀ értékeket összehasonlítottuk a vezikuláris transzportban mért IC₅₀-ekkel. A vizsgált molekulák mindkét esszében kölcsönhatottak az egér Abcb11 transzporterrel, ugyanakkor az is elmondható,

hogy az ATPáz esszével 2-3-szor alacsonyabb IC₅₀ értékeket kaptunk. A különbségre egyelőre magyarázatot adni nem tudunk.

Több különböző *in vitro* esszé áll rendelkezésre a toxicitás tesztelésére az *in vivo* kísérleteket megelőzőleg, mint pl. a kanalikuláris vezikula preparátumok, vagy a hepatocitákból álló ún. szendvicskultúrák. Azonban ezek egy részéhez radioaktív anyagok használata szükséges, más esszétípusok pedig bonyolult analitikát igényelnek. A kanalikuláris vezikula preparátumok további hátránya, hogy több, fiziológiásan jelenlévő transzportert is tartalmaz, amely megnehezíti a gyógyszerjelölt és egy adott transzporter kölcsönhatásának detektálását. Ezekkel szemben rendkívül nagy előnye az Sf9 sejtekből preparált membránvezikulákon végzett ATPáz esszének, hogy gyors, a vizsgálni kívánt fehérjét nagy mennyiségben tartalmazza (kb. 3%), a detektálás pedig egyszerű kolorimetriás mérésből áll¹⁰⁵. Így lehetőség nyílik arra, hogy nagyon sok molekulát viszonylag rövid idő alatt teszteljünk az adott transzporterre, kiegészítve ezzel a más *in vitro* és *in vivo* esszékből kapott eredményeket.

Az ABCB1 és gyógyszerjelölt kölcsönhatásának detektálására az ATPáz esszé az egyik leggyakrabban alkalmazott tesztelési módszer a gyógyszeriparban. Egyszerű, reprodukálható és a jelölt-transzporter interakciók jelentős hányada azonosítható abban az esetben, ha aktiválási és gátlási tesztet is végeznek¹⁵².

Az Sf9 sejtek membránjának koleszterinnel való feltöltése, a fiziológiához közelebb álló lipidkörnyezetet teremt az ABCB11/Abcb11 transzporter számára, megtartva ugyanakkor e rendszer előnyeit, az egyedülállóan magas fehérjeexpressziót és membránvezikula hozamot. A koleszterinfeltöltés által stimulált egér Abcb11-HAM membránvezikulák ATPáz esszéje által egy rendkívül robosztus és nagy áteresztőképességű (*high throughput*) tesztelésre alkalmas rendszert sikerült kifejlesztenünk.

7 Az eredmények jelentősége

A RA, amely a világ lakosságának átlagosan 1%-át érinti, a fejlett országokban a rokkantság vezető oka. Terápiájának alapját képezik a bázisterápiás szerek, amelyek lassan, de tartósan hatnak, csökkentik az ízületi gyulladást, a fájdalmat, képesek lelassítani a betegség előrehaladását. Ma a korszerű terápia során a betegek elsőként metotrexátot kapnak, de a leflunomid is elfogadott bázisterápiás szer, a felnőttkori RA kezelésében. Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a metotrexát az ABCG2 fehérje szubsztrátja, és ezt a feltevést kísérleti eredményeinkkel a leflunomid esetében is sikerült igazolnunk. Továbbá azt is bebizonyítottuk, hogy a két molekula kompetitíven gátolja egymás ABCG2 általi transzportját. Ezek alapján feltételezzük, hogy az ABCG2 kulcsfontosságú szerepet játszik a bázisterápiás szerekkel szemben kialakult rezisztenciában, amely a betegek egy jelentős részében hosszútávon csökkenti az alkalmazott gyógyszerek hatékonyságát. A kapott eredmények fényében a RA terápiájának egy újfajta megközelítése is megfontolandó, amelyben a kezelés mellett fontos lehet az ABCG2 transzporter gátlása is specifikus inhibítorral vagy akár más bázisterápiás vegyülettel is.

Az ABCB11 fehérje aminosavsorrendje nagy mértékben hasonlít az ABCB1-éhez. A májsejtek kanalikuláris membránjában lokalizálódva kulcsfontosságú szerepet tölt be az epesók kipumpálásában. Mivel az emberi szervezetben ez az egyetlen fehérje, amely képes kolátokat eliminálni a hepatocitákból, így a gyógyszerfejlesztések során kritikus kérdés a jelölt ABCB11 fehérjével való esetleges interakciója, amely az epesók sejten belüli toxikus koncentrációját eredményezheti. A májsejtek koleszterinben gazdag sejtmembránnal rendelkeznek, több itt kifejeződő ABC transzporterről megmutatták, hogy a membránkörnyezet koleszterintartalma pozitívan befolyásolja a működésüket. Kísérleteink során igazoltuk, hogy az egér, a patkány és a humán ABCB11 érzékeny a membrán koleszterintartalmára, így ha feltöltöttük az Sf9 sejtek membránját koleszterinnel, akkor a fiziológiáshoz jobban hasonlító, robosztusabb rendszert kaptunk. A bakulovírussal fertőzött rovarsejtek aplikálásával más rendszerekhez viszonyítva magasabb fehérje expresszió érhető el, ezért széles körben alkalmazott különböző fehérjék kifejezésére. Az ily módon kifejlesztett membránok segítségével elvégzett vezikuláris transzport esszé lehetőséget ad arra, hogy a fajok – humán, egér és patkány – közötti gyógyszertranszporbeli különbségeket vizsgáljuk az ABCB11/Abcb11 fehérje esetében.

8 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom dr. Krajcsi Péternek, a Solvo Biotechnológiai ZRt Kutatási Igazgatójának a lehetőségért dolgozatom elkészítéséhez. Széleskörű szakmai tájékozottságával, hasznos tanácsaival támogatta, irányította munkámat.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Kovács L. Kornélnak, a Biotechnológiai Tanszék Tanszékvezetőjének, belső konzulensemnek, hogy kapcsolatot teremtett a SZTE és a Solvo ZRt között, és ezzel lehetőséget adott munkám elkészítéséhez.

Köszönet a Solvo ZRt szegedi és budaörsi laboratórium és iroda minden munkatársának segítségükért, támogatásukért. Különösen hálás vagyok dr. Herédi-Szabó Krisztinának, dr. Nagy Tündének, dr. Glavinas Hristosnak és dr. Pál Ákosnak munkám elkészítéséhez nyújtott szakmai és baráti segítségért.

9 Összefoglaló

Bevezetés

Az ABC transzporterek egy nagy fehérjecsalád tagjai, amelyek szerteágazó funkciót töltenek be az élő szervezetben; többek között a detoxifikációt (ABCB1, ABCC1), a xenobiotikumokkal és oxidatív stresszel szembeni védelmet (ABCC család tagjai), a lipid metabolizmusban való részvételt (ABCA1, ABCB4, ABCG család tagjai), valamint az antigénprezentációt is (TAP1, TAP2) stb.

Ennek ellenére, a tumorok multidrog rezisztenciája (MDR) az, amely elsőként eszünkbe jut a fehérjecsalád említésekor. Az ABCB1 felfedezése óta nyilvánvalóvá vált, hogy egy, a membránban elhelyezkedő fehérje milyen jelentősen tudja befolyásolni az alkalmazott terápia eredményességét. Hiszen az ABCB1 expresszió szelekciós előnyt jelent a tumoros sejtek a citosztatikumkezelés során, mivel az adott szerre, illetve más molekulákra is keresztrezisztens populáció fog túlélni és szaporodni. A multidrog rezisztencia jelenség kapcsán az ABCB1 mellett még két ABC transzportert emelhetünk ki, ezek az ABCC1 és az ABCG2. Az MDR jelensége nemcsak a daganatos betegségek kezelése esetén merülhet fel, hanem pl. olyan krónikus gyulladásos,- és autoimmunbetegségek esetében is, ahol a gyógyszerek viszonylag hosszantartó alkalmazása szükséges.

A rheumatoid arthritis (RA) egy olyan krónikus betegség, amely az ízületek gyulladásával jellemezhető. Az ún. DMARD (disease modifying anti-rheumatic drug), bázisterápiás vegyületek a RA kezelésében alkalmazott olyan elsővonalbeli szerek, melyek a tünetek enyhítésére és a strukturális károsodás progressziójának lassítására szolgálnak. Korai alkalmazásuk rendkívül fontos az ízületi deformitás és a rokkantság megelőzése érdekében. Ezen molekulákra jellemző, hogy hetekig, akár hónapokig is kell alkalmazni őket ahhoz, hogy hatékonyak legyenek. A kialakult rezisztencia azonban meglehetősen összetett, köszönhető egyrészt az ABC transzportereknek, de a sérült gyógyszerfelvétel, aktiváció és megnövekedett detoxifikáció is szerepet játszik. Egyes bázisterápiásvegyületek bizonyítottan szubsztrátjai az ABC transzportereknek és több esetben sikerült a kezelés hatására, megemelkedett ABC fehérje expressziót detektálni. Megfigyelték, hogyha humán T limfocitákat szulfaszalazin jelenlétében tenyésztettek, akkor a rezisztens populáció ABCG2-t expresszált és leflunomidra is rezisztens volt.

A leflunomid az első, kifejezetten a RA kezelésére kifejlesztett bázisterápiás vegyület. Ez a molekula egy izoxazol származék, amely a mitogén-stimulált T- és B-limfociták proliferációját gátolja oly módon, hogy blokkolja a *de novo* UMP-szintézis kulcsenzimét a dihydroorotát dehydrogenázt. Prodrug-nak tekinthető, hiszen a szervezetbe kerülve egy gyors reakció során a biológiai hatásért felelős molekula, az A771726, vagy más néven teriflunomid képződik belőle.

Az utóbbi évek kutatásai világítottak rá arra tényre, hogy a sejtmembránt nem tekinthetjük egy homogén lipid kettősrétegnek, hiszen különböző lipidekben és fehérjékben gazdag régiókból, doménekből épül fel. Raftoknak vagy kaveoláknak nevezik azokat a 10-200 nm nagyságú a membrán lipid kettősrétegében elhelyezkedő struktúrákat, amelyek rendkívül gazdagok szfingolipidben és koleszterinben. Ezekről a mikrodoménekről bebizonyították azt is, hogy számos különböző fehérjét lokalizálnak, pl. az ABC transzporterek közül az ABCB1-et, az ABCC1-et, az ABCC2-t és az ABCG2-t. Korábban laboratóriumunkban ABCG2-t expresszáló Sf9 sejtekből preparált membránvezikulákon végzett ATPáz kísérletekkel sikerült bizonyítani, hogy a membránkörnyezet koleszterintartalma pozitívan befolyásolja a fehérje működését, ezáltal a koleszterinnel feltöltött ABCG2-t expresszáló Sf9 membránpreparátumok ugyanolyan jól használhatóvá válnak, mint az emlős rendszerek. Ugyanis korábbi tanulmányok bebizonyították, hogy az Sf9 rovarsejtek membránjának megközelítőleg 20-szor alacsonyabb a koleszterintartalma az emlős sejtek plazmamembránjához képest.

Az ABCB11 esetében korábban az irodalomban ellentmondó eredmények voltak arra vonatkozólag, hogy a membrán koleszterintartalma hogyan befolyásolja a transzporter működését. Hoda és munkatársai epeköre hajlamos (C57L/J) és rezisztens (AKR/J) egerek kanalikuláris membránját vizsgálva azt tapasztalták, hogy a C57L/J egerekben megemelkedett ABCB11 expresszió alacsonyabb taurokolát transzporttal jár és ők ezt a megemelkedett koleszterintartalommal magyarázták. Ugyanakkor tény, hogy a korábban már említett membrán koleszterintartalomra érzékeny pumpák – úgy mint ABCB1, ABCC2, ABCG2 – szintén részt vesznek a különböző szervezetből eltávolítandó molekulák epén keresztüli eliminációjában.

Az ABCB11 fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a kanalikuláris epesó transzportban, szabályozza a hepatocitákban, valamint gyakorlatilag az egész szervezetben az epesó koncentrációját. A hepatotoxicitás manapság az egyik legkritikusabb pontja a gyógyszerfejlesztésnek. Az esetek egy részében a toxicitás oka az, hogy az ABCB11 drogok általi gátlása miatt az epesók nemkívánt mennyiségben halmozódnak fel a hepatocitákban.

Számos molekuláról már a preklinikai kísérletek során kiderül, hogy májkárosodást okoz, ugyanakkor sok esetben – a molekulák közel 50%-ánál – erre csak a Fázis I klinikai kísérletei során derül fény. Ez többek között azzal magyarázható, hogy az adott molekula a preklinikai vizsgálatokhoz alkalmazott kísérleti állatban és az emberi szervezetben eltérő mértékben okoz hepatotoxicitást.

A patkány és az egér a leggyakrabban alkalmazott faj a gyógyszerek preklinikai fejlesztése során a gyógyszer farmakokinetikai sajátosságainak *in vivo* becslésére. Ezekből az *in vivo* eredményekből szokás a humán *in vivo* farmakokinetika becslése, ami elengedhetetlen része a klinikai kipróbálás megkezdésének. Ahhoz, hogy korrekt *in vivo* korrelációra esélyünk legyen, összehasonlító vizsgálatokat kell végezni egy olyan rendszeren, ahol azonos expressziós rendszerben vagy a humán vagy az egér vagy a patkány transzporter expresszálódik.

Célkitűzések

1./ A bevezetőben említett terápiás területeken (daganatos betegségek, gyulladásos, -és autoimmunbetegségek) alkalmazott gyógyszermolekulák tesztelése a multidrogrezisztenciában szerepet játszó transzportereket kifejező MDR1-Sf9 (ABCB1-et), MRP1-Sf9 (ABCC1-et), valamint korábban a laboratóriumunkban kifejlesztett HT-BCRP-HAM-Sf9 (high-throughput) membránpreparátumok alkalmazásával abból a célból, hogy a korábban nem karakterizált kölcsönhatásokat leírjuk. Előzetes kísérleteink alapján specifikus kölcsönhatást figyeltünk meg az ABCG2 fehérje és a leflunomid molekula között. Célunk volt ezen kölcsönhatás természetének jellemzése különböző *in vitro* tesztrendszerek segítségével.

2./ Kíváncsiak voltunk arra, hogy a koleszterinnek az ABCG2-re való potencírozó hatása tapasztalható-e más olyan ABC transzporter esetében is, mint az ABCB11, amely az ABCG2-höz hasonlóan szintén a hepatociták koleszterinben gazdag kanalikuláris membránjában fejeződik ki. Célul tűztük ki, az így kifejlesztett BSEP-HAM-Sf9 (ABCB11-et expresszáló) membránok jellemzését, valamint korrelációs vizsgálatok végrehajtását a már rendelkezésre álló ABCB11 membránokkal vezikuláris transzport kísérletekben. Ezzel párhuzamosan ismert hepatotoxikus gyógyszerek fajok közötti affinitáskülönbségeinek vizsgálatát is el kívántuk végezni.

3./ Az egér Bsep-HAM-Sf9 (egér Abcb11-et kifejező) membrán ATPáz esszéjének adaptálásával egy széleskörűen alkalmazható nem radiokatív teszt kifejlesztése és optimalizálása is célunk volt. Ismert ABCB11 szubsztrátok segítségével validálni kívántuk az ATPáz esszében mért értékeket.

Eredmények és azok megbeszélése

Új szubsztrát-transzporter kölcsönhatások detektálása és karakterizálása HT *in vitro* esszéekkel

Kísérleteink során egy meglehetősen specifikus, mindeddig ismeretlen interakciót figyeltünk meg az ABCG2 és a reumatoid arthritis terápiájában gyakran alkalmazott leflunomid között. Különböző membránalapú és egész sejt alapú *in vitro* esszék segítségével sikerült jellemezni az ABCG2 és leflunomid, valamint a metabolitja, az A771726 között megfigyelt kölcsönhatást. Azt tapasztaltuk, hogy a fent említett molekulák az ABCG2 fehérje szubsztrátjai, ugyanis aktiválják az ABCG2-t ATPáz esszében, kompetitíven gátolják az ABCG2 általi metotrexát transzportot, valamint az ABCG2-nek köszönhetően kevésbé toxikusak a transzportert expresszáló sejtvonalra.

A metotrexát egy ismert ABCG2 szubsztrát, amelyet gyakran alkalmaznak vezikuláris transzport kísérletekben. Ez a gátláson alapuló *in vitro* esszé alkalmas arra, hogy metotrexát-drog kölcsönhatásokra derítsen fényt. A leflunomid és a metabolitja is koncentrációfüggően gátolta az ABCG2 általi metotrexát transzportot a kifordított BCRP-HAM-Sf9 vezikulákba. A két molekula affinitása azonban eltérő, hiszen míg a leflunomid esetén 1,86 μM , addig az A771726 esetében 0,093 μM K_i értéket számoltunk. A Dixon-féle ábrázolással azt is sikerült megállapítani, hogy ez a gátlás kompetitív típusú.

A kinetikai paraméterekben, az EC_{50} értékekben észlelt eltérés az ATPáz esszé esetében is megfigyelhető volt (3,93 μM és 0,78 μM). Mindkét molekula koncentrációfüggően stimulálta az ABCG2 ATPáz aktivitását, amely szubsztrát természetére utalhat.

A Hoechst 33342 egy membránpermeabilis festék, amely kiváló szubsztrátja az ABCG2-nek. A festéket alkalmazó esszé, amelyet a transzportert expresszáló sejteken végeztünk, alkalmas a tesztanyagok és a transzporter közötti kölcsönhatás nyomonkövetésére. A leflunomid és a metabolitja is gátolta az ABCG2 általi Hoechst 33342 transzportot azonos nagyságrendbe eső IC_{50} értékekkel (4,53 μM és 2,87 μM).

Abból a célból, hogy megerősítsük azt a sejtésünket, hogy ezen molekulák nemcsak kölcsönhatói, hanem szubsztrátjai is az ABCG2-nek, citotoxicitási esszét végeztünk a transzportert expresszáló és

üres vektorral transzfektált HEK293 sejteken. Az ABCG2-t expresszáló sejtek 20,6- szor, valamint 7,5-ször voltak rezisztensebbek a leflunomidra és az A771726-ra a HEK293-mock sejteknél. Mivel ez a rezisztencia ABCG2 specifikus inhibitor segítségével visszafordítható volt, sikerült bizonyítani, hogy ez folyamat az ABCG2-nek köszönhető oly módon, hogy a transzporter csökkenti a drogok intracelluláris koncentrációját.

A leflunomid egy viszonylag új bázisterápiás vegyületnek számít, amelyet monoterápiában, valamint más bázisterápiás szerekkel és nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentőkkel kombinálva is alkalmaznak a RA terápájában. Több tanulmány is beszámol arról, hogy, ha egy hosszabb már kevésbé hatékony metotrexát-kezelést leflunomiddal egészítenek ki, akkor a beteg tüneteinek javulása figyelhető meg. Ez kísérleti eredményeink szerint magyarázható a vizsgált molekulák, valamint a metotrexát között fellépő kompetitív inhibícióval, amely az egyik vagy másik gyógyszer intracelluláris koncentrációjának emelkedését eredményezi. Ezen eredmények képezhetik az alapját a RA-terápia egy újfajta megközelítésének, amelyben kezelés mellett fontos lehet az ABCG2 transzporter gátlása is specifikus inhibitorral vagy akár más bázisterápiás vegyülettel is. Feltételezzük, hogy az ABCG2 fehérje fontos szerepet játszik az ABCG2 szubsztrát bázisterápiás gyógyszerekkel szembeni rezisztenciában. Ez a hipotézisünk azóta megerősítést nyert, hiszen van der Heijden és munkatársai megmutatták, hogy a metotrexátra illetve leflunomidra rezisztens betegek szinoviális makrofágjaiban az ABCG2 szintje szignifikánsabban magasabb, mint a terápiára jól reagáló betegek esetében.

A közeljövőre vonatkozóan azt a célt tűztük ki, hogy a fent említett terápiás területekről kiválasztott gyógyszerek és a releváns ABC transzporterek közötti különböző, általunk kifejlesztett és alkalmazott *in vitro* esszékből megfigyelt kölcsönhatást kinetikai szempontból jellemezzük. Az így kapott paraméterek, úgymint EC_{50} és IC_{50} értékek segítségével egy kisebb adatbázist szeretnénk létrehozni, illetve az irodalomban korábban még nem leírt interakciókat jellemezni. Ezen adatok alapját képezhetik az egyénre szabott terápiának, hiszen ha a beteg MDR-ABC transzporter profilja ismert, olyan gyógyszer kerülhet alkalmazásra, amely esetén nem lép fel MDR-jelenség. A hematológiai tumorok esetében rendelkezésre áll egy olyan tesztrendszer, amely a Calcein-esszén alapulva a funkcionális ABCB1 és ABCC1 mennyiségét határozza meg, és jelenleg dolgozunk a kit ABCG2 szint mérésére alkalmas bővítésén.

A membrán koleszterintartalmának hatása az egér, patkány és humán ABCB11 működésére

Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az egér, patkány és humán ABCB11 is érzékeny a membrán koleszterintartalmára, hiszen megemelkedett transzportsebességeket mértünk abban az esetben, ha megnöveltük az Sf9 sejtek plazmamembránjának koleszterintartalmát. Ez a potencírozó hatás a V_{\max} növekedésén túl jelentős mértékben nem befolyásolta az epesó transzportok K_M értékét, azaz nem volt hatással az affinitásra. A koleszterin ezen hatása az ABCB11/Abcb11 fehérjékre nem teljesen tisztázott. Feltételezésünk szerint allosztérikus modulátorként hat a fehérjére, vagy pedig a membrán fluiditását változtatja meg. A legújabb publikációk alátámasztják ezen eredményeinket, ugyanis Paulusma és munkatársai ATP8B1 hiányos egér kanalikuláris membránját vizsgálva – amelynél a koleszterintartalom jelentősen lecsökkent – azt tapasztalták, hogy az Abcb11 fehérje általi transzport kb. negyede, a vad típus esetében tapasztaltak. A kísérleteket a koleszterin *in vitro* kivonásával elvégezve is hasonló eredményeket kaptak. Saját munkánkkal párhuzamosan Ismaier és munkatársai által az is bizonyítást nyert, hogy az ABCB11 a kanalikuláris membrán koleszterinben gazdag raft régiókban lokalizálódik.

Vizsgálataink során a kiválasztott, bizonyítottan hepatotoxikus gyógyszerek epesó transzportra gyakorolt hatásaiknál az affinitásban jelentős különbségeket tapasztaltunk. A glibenklamid és a troglitazon esetében a humán fehérje rendelkezett a legnagyobb affinitással, legkisebbel pedig az egér ortológ. A ciklosporin A kapcsán mért IC_{50} értékek között nemcsak a fajok között, hanem egy fajon belül a különböző epesók között is jelentős különbségek voltak. Az általunk kapott eredményeket összehasonlítva az irodalomban található TC transzportra vonatkozó adatokkal elmondható, hogy a glibenklamid és CSA esetében kétszeres különbség van a humán ABCB11-nél és 3-6-szoros a patkánynál, ugyanakkor a drogok affinitási sorrendje – CSA < troglitazon ~ glibenclamid – megegyezik.

Annak érdekében, hogy a megváltoztatott lipidkörnyezetű membránban kifejezett fehérjékkel mért kísérletek során kapott eredményeket validáljuk, kiválasztottunk egy kilenc kolesztatikus molekulából álló szettet, amelyeket kontroll és HAM humán ABCB11-en is megmértünk. A molekulák IC_{50} értékeit figyelembe véve nem tapasztaltunk különbséget a kontroll és koleszterinnel feltöltött vezikulák között egy kivételtől eltekintve: ez a gyógyszer a ciklosporin A, amely esetében a különbség közel tízszeres volt. Ez a molekula úgy tűnik nemcsak a különböző epesókra, hanem a membrán koleszterintartalmára is meglehetősen érzékeny.

Az egér Bsep-HAM ATPáz esszé kifejlesztése

Kísérleteink során sikerült megmutatni, hogy az egér Abcb11 transzporter is érzékeny a membrán koleszterintartalmára. TCDC-ot szubsztrátként alkalmazva az Sf9 membrán koleszterinfeltöltésének hatására ATPáz esszében nagyobb ATPáz aktivitást, vezikuláris transzport esszében pedig magasabb transzport értéket mértünk. A megemelkedett koleszterinszint ATPáz esszében az alapaktivitás csökkenésével járt, amely így egy jobb jel/zaj arányú esszét eredményezett.

Az egér Bsep-HAM vezikulák ATPáz aktivitása idő, hőmérséklet, valamint ATP függőnek bizonyult. Az esszé körülményeinek optimalizálása után egy kiválasztott molekulaszett segítségével – amely vegyületekről az irodalomban leírták, hogy hepatotoxicitást okoznak – a mért IC₅₀ értékeket összehasonlítottuk a vezikuláris transzportban mért IC₅₀-ekkel. A vizsgált molekulák mindkét esszében kölcsönhatottak az egér Abcb11 transzporterrel, ugyanakkor az is elmondható, hogy az ATPáz esszével 2-3-szor alacsonyabb IC₅₀ értékeket kaptunk. A különbségre egyelőre magyarázatot adni nem tudunk. Több különböző *in vitro* esszé áll rendelkezésre a toxicitás tesztelésére az *in vivo* kísérleteket megelőzőleg, mint pl. a kanalikuláris vezikula preparátumok, vagy a hepatocitákból álló un. szendvicskultúrák. Azonban ezek egy részéhez radioaktív anyagok használata szükséges, más esszétípusok pedig bonyolult analitikát igényelnek. Ezekkel szemben rendkívül nagy előnye az Sf9 sejtekből preparált membránvezikulákon végzett ATPáz esszének, hogy gyors, a detektálás pedig egyszerű kolorimetriás mérésből áll. Így lehetőség nyílik arra, hogy nagyon sok molekulát viszonylag rövid idő alatt teszteljünk az adott transzporterre, kiegészítve ezzel a más *in vitro* és *in vivo* esszékből kapott eredményeket.

Az Sf9 sejtek membránjának koleszterinnel való feltöltése, a fiziológiához közelebb álló lipidkörnyezetet teremt az ABCB11/Abcb11 transzporter számára, megtartva ugyanakkor e rendszer előnyeit, az egyedülállóan magas fehérjeexpressziót és membránvezikulahozamot. A koleszterinfeltöltés által stimulált egér Abcb11-HAM membránvezikulák ATPáz esszéje által egy rendkívül robosztus és nagy áteresztőképességű (*high throughput*) tesztelésre alkalmas rendszert sikerült kifejlesztenünk.

10 Summary

Introduction

The ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily is one of the largest family in field of the transmembrane proteins. Members of this superfamily cover a broad spectrum of physiological functions including detoxification, defense against xenobiotics and oxidative stress, absorption, distribution and excretion processes as well as lipid metabolism.

The multidrug resistance phenotype in tumors can be associated with the overexpression of certain ABC transporters, termed MDR proteins. The P-glycoprotein – ABCB1 – mediated multidrug resistance was discovered first and probably still is the most widely observed mechanism in clinical multidrug resistance. Two other ABC transporters have been demonstrated to participate in the multidrug resistance of tumors: the multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1), and the breast cancer resistance protein (ABCG2).

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic disease characterized by inflammation of the lining or synovium of the joints. There are three general classes of drugs commonly used in the treatment of RA: non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), corticosteroids, and disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs). One of the drawbacks is that while NSAIDs and corticosteroids have a short onset of action, DMARDs can take several weeks or months to display clinical effect. Moreover, due to the long-term application of the drugs many RA patients demonstrate loss of efficacy over time. DMARDs resistance may be a multifactorial event including enhanced drug efflux *via* ABC transporters, impaired drug uptake and drug activation, enhanced drug detoxification etc.

ABC transporters likely play a role in drug resistance to DMARDs. Previous studies revealed that ABCB1 expression was higher in the peripheral blood lymphocytes of prednisolone and DMARD-treated patients than in controls Llorente and colleagues observed a difference in the expression of ABCB1 among patients who did not respond to therapy and those patients who did. Others found ABCC1 overexpression in the chloroquine resistant human CEM T cells. When human T lymphocytes were selected in the presence of sulfasalazine, the resistant population overexpressed ABCG2 and displayed lower sensitivity (5-fold) to leflunomide too. However, as the authors did not show that the phenomenon can be modelled in a transfected system they did not explicitly identify ABCG2 as the only factor responsible for resistance to sulfasalazine and leflunomide.

Leflunomide is a DMARD with an isoxazole ring that inhibits proliferation of mitogen-stimulated T- and B-lymphocytes by a non-cytotoxic. It inhibits the dihydroorotate dehydrogenase, a key enzyme in the pathway for *de novo* synthesis of UMP. Leflunomide is a pro-drug that undergoes rapid nonenzymatic conversion to its active form, A771726. Leflunomide is used either alone or in combination with methotrexate in the therapy of RA.

During the past few years it became clear that the plasma membrane not only consist of a uniform phospholipid bilayer but is rather laterally segregated into different plasma membrane domains that consist of a variety of different lipids and proteins. These small (10-200 nm) cholesterol-enriched microdomains are called lipid-raft or membrane-raft. The importance of the membrane lipid composition for the function of membrane proteins has been demonstrated for a number of relevant proteins involved in signal transduction and membrane trafficking. In addition several reports found ABC transporters (ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2) localized in these microdomains. No study had been published on microdomain localization of the ABCB11 transporter, although this transporter is expressed on the cholesterol-rich apical membrane of the hepatocyte.

Bile acids are oxidation products of cholesterol, synthesized by the hepatocytes, and transported as bile salts by the ABCB11 to the bile. In humans there is no compensatory mechanism for the loss of this transporter, as mutations of ABCB11 result in a genetic disease, called progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) and inhibition of ABCB11 by drug molecules leads to clinical cholestasis. Therefore there is an increasing need for reliable, validated screening tools suited to test drug candidates for ABCB11 interaction potential, during the process of drug development.

ABCB11 protein is highly identical with its rodent (rat and mouse) orthologs. Gene knockout or transgenic mouse models are important *in vivo* systems for studying the role and regulation of the Bsep gene. *In vitro* expression of the mouse, rat and human ABCB11 protein makes the analysis of the functional interspecies differences possible and forecast or validate the *in vivo* results through membrane based high throughput assays, like the vesicular transport assay and the ATPase assay.

Aims of the work

1./ The major goal was to test drugs from that application fields where MDR phenomenon appears (autoimmune disease, cancer disease, inflammation disease). Using relevant ABC transporter expressing test systems – ATPase assay, vesicular assay and whole cell based assays – we wanted to show and characterize earlier not described interactions. Our preliminary experiments suggest a very specific interaction between ABCG2 protein and leflunomide. Our goal was to describe the nature of this interaction.

2./ We hypothesized that cholesterol modulates rat, mouse and human ABCB11 activity which are localized in the cholesterol-rich canalicular membrane of the liver cells. As native Sf9 membranes contain much less cholesterol than mammalian cells, we have developed a cholesterol-enriched Sf9 membranes that are better mimics of the mammalian membranes. We have also examined affinity differences between the mouse, rat and human ABCB11 mediated bile salts (taurocholate, glycocholate, taurochenodeoxycholate, glycochenodeoxycholate) transports using compounds which cause clinical cholestasis, namely cyclosporin A, troglitazone and glibenclamide.

3./ Cholesterol enrichment of mBsep-Sf9 (expressing mouse Abcb11) vesicles resulted in a membrane product that is suitable for high-throughput screening for bile salt export pump interactors using the ATPase assay. Our goal was to develop and optimize this nonradioactive methods.

Results and discussion

Detection and characterization of substrate-transporter interaction using HT *in vitro* assays

Different membrane and whole cell based assays were performed to investigate and characterize the interaction between the transporter, ABCG2 and the analyzed compounds, leflunomide and its metabolite, A771726. We have found that both compounds interacted with ABCG2 and are transported substrates of the transporter based on several facts: both compounds activated the ABCG2 transporter in the ATPase assay; both proved to be competitive inhibitors of methotrexate

transport by ABCG2 and the resistance to their cytotoxic effects could be reversed in the presence of a ABCG2-specific inhibitor, Ko134.

ABCG2 was shown to be important in the defense mechanism of immune-competent cells, such as stem cells or monocyte-derived dendritic cells. ABCG2 could play an important role in inflammatory processes, because it was shown that it is expressed on endothelial cells and macrophages in the synovial sublining of RA patients. It was suggested that the expression of this ABC transporter is rather inflammation dependent than drug-induced. However, previous studies indicated that ABCG2 overexpressing population is selected upon treatment of cells with escalating dose of various drugs and the breast cancer resistance protein is important in the absorption and elimination of DMARDs, such as sulfasalazine and methotrexate.

Methotrexate is a known ABCG2 substrate, which is commonly used in vesicular transport studies. This inhibition type membrane based assay is suitable to study the effect of the test drug on the accumulation of a transported substrate. By using a relevant drug molecule as a reporter substrate, potentially important drug-drug interactions can be detected in a simple *in vitro* system. Both leflunomide and A771726 inhibited the accumulation of methotrexate into inside-out BCRP-HAM-Sf9 vesicles in a dose-dependent manner, but with different affinities. Leflunomide inhibited methotrexate transport with higher K_I (1.86 μM) than A771726 (0.093 μM). Furthermore, the Dixon plots revealed that the mechanism of action between methotrexate and leflunomide or A771726 is competitive inhibition.

This difference in kinetic parameters is also observed in the ATPase assay. The modulation of baseline ATPase activity may indicate the substrate nature of a compound. Leflunomide and A771726 stimulated the vanadate sensitive ATPase activity of the ABCG2 transporter in the ATPase assay with 3.93 μM and 0.78 μM EC_{50} values, respectively.

Hoechst 33342 is a membrane permeable dye which is an excellent substrate of ABCG2. This cellular assay is suitable to follow the interaction between the ABCG2 transporter and test drugs. Both substrates and inhibitors increase the cellular accumulation of the dye through ABCG2 interaction. Leflunomide and its metabolite inhibited the Hoechst efflux with nearly same IC_{50} values; 4.53 μM and 2.87 μM .

We performed 96-hour cytotoxicity assays using empty vector transfected HEK293 cells and the ABCG2 transporter expressing clones. HEK293-BCRP cells showed 20.6 and 7.5-fold resistance compared to the mock HEK293 in the case of leflunomide and A771726. This increased resistance is attributable to the ABCG2 transporter because it could be reversed by a known specific ABCG2

inhibitor, Ko134. This assay set up is considered as a surrogate transport assay, as it refers directly to the involvement of a specific transporter and its role in resistance to the drug tested.

Leflunomide is a commonly used new DMARD applied in monotherapy or in combination therapy with non steroidal anti-inflammatory drugs. Moreover, it is applicable to treat active rheumatoid arthritis in combination with other disease modifying antirheumatic drugs, like methotrexate, sulfasalazine, infliximab, adalimumab, etanercept and anakinra.

Leflunomide is used in combination therapy with methotrexate in case resistance is developed for the latter mentioned DMARD. Several studies confirmed that administration of leflunomide together with methotrexate can lead to improved patient condition. This may be at least in part due to the competitive inhibition between methotrexate and leflunomide or A771726 leading to increased local concentrations of one both drugs. Our findings can be the basis of new therapeutic approaches, such as the local administration of ABCG2 reversing agents in combination with DMARDs.

Effect of membrane cholesterol level on mouse, rat and human ABCB11 activity

We have shown that cholesterol treatment has an effect on ABCB11 activity, namely, increasing V_{max} values, without producing a significant shift in K_M values. Cholesterol loading had the most pronounced effect on rat Abcb11 increasing intrinsic clearance values for taurocholate (TC), glycocholate (GC) and taurochenodeoxycholate (TCDC) 3-5-fold. In a study published simultaneously with our study raft localization of ABCB11 was shown and a study published right after our paper confirmed the crucial role of cholesterol in ABCB11 activity.

We tested 3 inhibitors with 4 substrates on ABCB11 transporters from 3 species (human, rat, mouse) in this novel high-throughput screening system. Our data show different patterns for cyclosporin A and troglitazone as well as glibenclamide. IC_{50} values for cyclosporin A varied greatly for all substrates for ABCB11 from the same species as well as more expectedly between species for the same substrate. For troglitazone and glibenclamide there was little variation within IC_{50} values for the different substrates within a species. In contrast, there were significant variations between species for the same substrate. Both glibenclamide and troglitazone displayed the lowest inhibitory potency towards the mouse protein. Interestingly though, for glibenclamide the IC_{50} values of the rat transporter are closer to the relevant data on the human transporter. While for troglitazone the IC_{50} values for the rat protein are closer to the data on the mouse protein.

Our results correlate reasonably well with published data. For human ABCB11-mediated TC transport inhibition the difference between our data and published results is about twofold for both glibenclamide and cyclosporin A. For rat Abcb11 mediated TC transport inhibition the differences between our data and published values differ 3-6-fold. However, the rankings (cyclosporin A<troglitazone~glibenclamide) in all studies are the same.

To ensure that the IC₅₀ values obtained are valid we tested a small set of compounds for their abilities to inhibit ABCB11-mediated TC transport both control and cholesterol-loaded Sf9 vesicles containing human ABCB11. All compounds inhibited TC transport near identical IC₅₀ values for the respective compounds in the membrane vesicles with different cholesterol content. The only outlier was cyclosporin A, where a difference close to 10-fold could be observed. Not only was this compound showing the greatest inter-species and bile salt variability, but also this was the one apparently sensitive for the cholesterol level of the membrane.

In general, we observed greater variations in species-specificity for inhibitors than for substrates.

Optimization of the mouse Bsep-HAM ATPase assay

In this study the mouse Abcb11 protein also proved to be sensitive for the cholesterol content of its membrane environment. Transport rate of the reporter substrate (TCDC) and the amount of phosphate generated in the presence of TCDC both increased in cholesterol loaded Sf9 membranes. The elevated cholesterol level leads to an approximately two-fold increase of V_{max} in the vesicular transport assay. In correlation with increased transport V_{max}, an increased maximal stimulation of ATPase activity was observed. However, in contrast to the results observed in the case of ABCG2, treatment of the Sf9 cells with cholesterol@RAMEB complex decreased the basal vanadate sensitive ATPase activity of the mouse Abcb11 protein. The combined effect of increased maximum value and decreased background resulted in a significantly better signal/ background ratio and a wider dynamic range.

The ATPase activity of the mBsep-HAM-Sf9 vesicles is time, temperature and ATP dependent. After the assay parameter set has been optimized, the results obtained from the mBsep-HAM-Sf9 ATPase assay were compared with those from the mBsep-HAM-Sf9 vesicles in the vesicular transport assay. Interestingly, slightly lower IC₅₀ values were obtained by the ATPase assay than by vesicular transport.

ABCB11 transporter plays a key role in canalicular bile salt transport and in regulating the bile salt concentration in the hepatocytes as well as in the systemic circulation. Identification of ABCB11

inhibitors, that reduce bile salt secretion thus causing cholestasis, is crucial in the early phase of drug development. Membrane based rodent transporter studies are promising tools for prediction of human interaction. The current transport assays all require fairly cumbersome, nongeneral analytical methods like LC/MS or the application of radiolabeled compounds. In contrast mBsep-HAM-Sf9 ATPase is a simple, high-throughput, sensitive, nonradioactive assay designed to detect drug-ABCB11 interaction. It can complement the human ABCB11 mediated TC transport inhibition studies and the *in vivo* rodent studies.

11 Irodalomjegyzék

¹ Ling V (1975) Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian cells. *Can J Genet Cytol* 17:503-15.

² Juliano RL and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162.

³ Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I and Gottesman MM (1986) Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 232:643-645.

⁴ Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V and Riordan JR (1986) The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 141:956-962.

⁵ Gros P, Croop J, Housman D (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47:371-80.

⁶ Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-9.

⁷ Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V (1986) Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324:485-9.

⁸ Hamada H, Tsuruo T (1988) Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. *J Biol Chem* 263:1454-8.

⁹ Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650-4.

¹⁰ Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42:1007-17.

¹¹ Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B (2004) The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv* 1:27-42.

¹² www.nutrigene.com

-
- ¹³ Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-73.
- ¹⁴ Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 22:347-51.
- ¹⁵ Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 22:352-5.
- ¹⁶ Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y, Kuwano M (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* 7:203-7.
- ¹⁷ Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, de Jong PT (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25:228-31.
- ¹⁸ Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346:362-5.
- ¹⁹ Deeley RG, Cole SP (1997) Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* 8:193-204.
- ²⁰ Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, Hunt JF (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure* 9:571-86.
- ²¹ Young SG, Fielding CJ (1999) The ABCs of cholesterol efflux. *Nat Genet* 22:316-8.
- ²² Kaminski WE, Orsó E, Diederich W, Klucken J, Drobnik W, Schmitz G (2000) Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7). *Biochem Biophys Res Commun.* 273:532-8.
- ²³ Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54:5902-10.

-
- ²⁴ Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG (1994) Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* :357-61.
- ²⁵ Deeley RG, Cole SP (1997) Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* 8:193-204.
- ²⁶ Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92:1295-302.
- ²⁷ Robbiani DF, Finch RA, Jäger D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ (2000) The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103:757-68.
- ²⁸ Schultz MJ, Wijnholds J, Peppelenbosch MP, Vervoordeldonk MJ, Speelman P, van Deventer SJ, Borst P, van der Poll T (2001) Mice lacking the multidrug resistance protein 1 are resistant to *Streptococcus pneumoniae*-induced pneumonia. *J Immunol* 166:4059-64.
- ²⁹ Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290:1771-5.
- ³⁰ Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361(6414):726-30.
- ³¹ Zhang F, Zhang W, Liu L, Fisher CL, Hui D, Childs S, Dorovini-Zis K, Ling V (2000) Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes. *J Biol Chem* 275:23287-94.
- ³² Abele R, Tampé R (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta* 1461: 405-19.
- ³³ Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, Yan AT, Cwirla SE, Grindstaff KK. (2008) Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*. 155:423-38.
- ³⁴ Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 61:3458-64.
- ³⁵ Brown DA (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology* 21:430-9.
- ³⁶ Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47:1597-8.

-
- ³⁷ Demeule M, Jodoin J, Gingras D, Béliveau R (2000) P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. *FEBS Lett.* 466:219-24.
- ³⁸ Hinrichs JW, Klappe K, Hummel I, Kok JW (2004) ATP-binding cassette transporters are enriched in non-caveolar detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains (DIGs) in human multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 279:5734-8 .
- ³⁹ Storch CH, Eehalt R, Haefeli WE, Weiss J (2007) Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 323:257-64 .
- ⁴⁰ Troost J, Albermann N, Emil Haefeli W, Weiss J (2004) Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 316:705-11.
- ⁴¹ Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M (1998) Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 273:32380-3.
- ⁴² Gimpl G, Klein U, Reilander H and Fahrenholz F (1995) Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. *Biochemistry* 34: 13794-13801.
- ⁴³ Glavinas H, Kis E, Pal A, Kovacs R, Jani M, Vagi E, Molnar E, Banshagi S, Kele Z, Janaky T, Bathori G, von Richter O, Koomen GJ, Krajcsi P (2007) ABCG2 (BCRP/MXR) ATPase assay – a useful tool to detect drug – transporter interactions. *Drug Metab Dispos* 35:1533-42.
- ⁴⁴ Pál A, Méhn D, Molnár E, Gedey S, Mészáros P, Nagy T, Glavinas H, Janáky T, von Richter O, Báthori G, Szenté L, Krajcsi P (2007) Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1085-94.
- ⁴⁵ Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491-502.
- ⁴⁶ Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-92.
- ⁴⁷ Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD, Borst P (2000) Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 105:279-85.
- ⁴⁸ Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol Rev* 86:1179-236.

-
- ⁴⁹ Sarkadi B, Szakács G, Váradi A. Multidrug resistance in Cancer- Role of ABC Transporter Protein. [www. sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
- ⁵⁰ Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Chirikuri A, O'Toole D, Mahmud N, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D (2000) High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology* 118:279-88.
- ⁵¹ Smith JB, Haynes MK (2002) Rheumatoid arthritis--a molecular understanding. *Ann Intern Med* 136:908-22.
- ⁵² Smolen JS, Steiner G (2003) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2:473-88.
- ⁵³ Wolfe F (1997) Adverse drug reactions of DMARDs and DC-ARTs in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 15(suppl 17):S75-81.
- ⁵⁴ Maetzel A, Wong A, Strand V, Tugwell P, Wells G, Bombardier C (2000) Metaanalysis of treatment termination rates among rheumatoid arthritis patients receiving disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Rheumatology* 39:975-81.
- ⁵⁵ Aletaha D, Smolen JS (2002) Effectiveness profiles and dose dependent retention of traditional disease modifying antirheumatic drugs for rheumatoid arthritis. An observational study. *J Rheumatol* 29:1631-8.
- ⁵⁶ Wolfe F (1995) The epidemiology of drug treatment failure in rheumatoid arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 9:619-32.
- ⁵⁷ Jansen G, Scheper RJ, Dijkmans BAC (2003) Multidrug resistance proteins in rheumatoid arthritis, role in disease-modifying antirheumatic drug efficacy and inflammatory processes:an overview. *Scand J Rheumatol* 32:325-336.
- ⁵⁸ Morgan C, Lunt M, Brightwell H, Bradburn P, Fallow W, Lay M (2003) Contribution of patient related differences to multidrug resistance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62:15-19.
- ⁵⁹ van der Heijden J, Dijkmans BAC, Scheper RJ, Jansen G (2007) Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs—from bench to bedside. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 3:26-34.
- ⁶⁰ Maillefert JF, Maynadie M, Tebib JG, Aho S, Walker P, Chatard C, Dulieu V, Bouvier M, Carli PM, Tavernier C (1996) Expression of the multidrug resistance glycoprotein 170 in the peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. The percentage of lymphocytes expressing glycoprotein 170 is increased in patients treated with prednisolone. *Br J Rheumatol* 35(5):430-5.
- ⁶¹ Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y (2007) Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:380-8.

-
- ⁶² Llorente L, Richaud-Patin Y, Díaz-Borjón A, Alvarado de la Barrera C, Jakez-Ocampo J, de la Fuente H, Gonzalez-Amaro R, Diaz-Jouanen E (2000) Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine* 67:30-9.
- ⁶³ Oerlemans R, van der Heijden J, Vink J, Dijkmans BA, Kaspers GJ, Lems WF, Scheffer GL, Ifergan I, Scheper RJ, Cloos J, Assaraf YG, Jansen G (2006) Acquired resistance to chloroquine in human CEM T cells is mediated by multidrug resistance-associated protein 1 and provokes high levels of cross-resistance to glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 54:557-68.
- ⁶⁴ van der Heijden, J, de Jong, MC, Dijkmans, BA, Lems, WF, Oerlemans, R, Kathmann, I, Schalkwijk, CG, Scheffer, GL, Scheper, RJ, Jansen, G (2004) Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNFalpha. *Ann Rheum Dis* 63:138-43.
- ⁶⁵ Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH (2001) Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60:729 – 35.
- ⁶⁶ Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP (2000) Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 47:247 – 57.
- ⁶⁷ Cronstein BN (1996) Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum* 39:1951 – 60.
- ⁶⁸ Peppercorn MA (1984) Sulfasalazine. Pharmacology, clinical use, toxicity, and related new drug development. *Ann Intern Med.* 101:377-86.
- ⁶⁹ Dijkmans BA, van den Borne BE, Landewe RB, Miltenburg AM, Verweij CL, Breedveld FC (1996) Chloroquine combined with cyclosporine in rheumatoid arthritis: more than the addition of 2 drugs alone. *J Rheumatol Suppl* 44:61-3.
- ⁷⁰ Herrmann ML, Schleyerbach R, Kirschbaum BJ (2000) Leflunomid: an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Immunopharmacology* 47:273-89.
- ⁷¹ Cao WW, Kao PN, Chao AC, Gardner P, Ng J, Morris RE (1995) Mechanism of the antiproliferative action of leflunomid. A77 1726, the active metabolite of leflunomid, does not block T-cell receptor-mediated signal transduction but its antiproliferative effects are antagonized by pyrimidine nucleosides. *J Heart Lung Transplant.* 14:1016-30.
- ⁷² Fox RI, Herrmann ML, Frangou CG, Wahl GM, Morris RE, Strand V, Kirschbaum BJ (1999) Mechanism of Action for Leflunomid in Rheumatoid Arthritis. *Clinical Immunology* 93:198-208.
- ⁷³ Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 13:379-93.

-
- ⁷⁴ Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P (2001) Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 299:164-70.
- ⁷⁵ Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, van Tellingen O (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2031-5.
- ⁷⁶ van Asperen J, van Tellingen O, Sparreboom A, Schinkel AH, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH (1997) Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833. *Br J Cancer* 76:1181-3.
- ⁷⁷ Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Schoots IG, Elferink RP (2001) Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats. *Mol Pharmacol* 59:974-80.
- ⁷⁸ Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD, Borst P (2000) Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 105:279-85.
- ⁷⁹ Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR (1998) Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol* 12:457-63.
- ⁸⁰ St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1495-503.
- ⁸¹ Lin JH, Chiba M, Chen IW, Nishime JA, deLuna FA, Yamazaki M, Lin YJ (1999) Effect of dexamethasone on the intestinal first-pass metabolism of indinavir in rats: evidence of cytochrome P-450 3A [correction of P-450 A] and p-glycoprotein induction. *Drug Metab Dispos* 27:1187-93.
- ⁸² Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V and Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58:5337-5339.
- ⁸³ Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK and Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15665-15670.
- ⁸⁴ Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59:8-13.

-
- ⁸⁵ Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG and Cowan K (2002) The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 8:22-28.
- ⁸⁶ Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99:507-12.
- ⁸⁷ Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7:1028-34.
- ⁸⁸ Merino G, van Herwaarden AE, Wagenaar E, Jonker JW, Schinkel AH (2005) Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Mol Pharmacol* 67:1765-71.
- ⁸⁹ Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC and Schinkel AH (2005) The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* 11:127-129.
- ⁹⁰ Mizuno N, Suzuki M, Kusuhara H, Suzuki H, Takeuchi K, Niwa T, Jonker JW, Sugiyama Y (2004) Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice. *Drug Metab Dispos* 32:898-901.
- ⁹¹ Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273:10046-50.
- ⁹² Arrese M, Trauner M, Ananthanarayanan M, Pizarro M, Solís N, Accatino L, Soroka C, Boyer JL, Karpen SJ, Miquel JF, Suchy FJ (2003) Down-regulation of the Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide during pregnancy in the rat. *J Hepatol* 38:148-55.
- ⁹³ Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633-71.
- ⁹⁴ Pauli-Magnus C, Meier PJ (2006) Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology* 44:778-87.
- ⁹⁵ Schuetz EG, Strom S, Yasuda K, Lecœur V, Assem M, Brimer C, Lamba J, Kim RB, Ramachandran V, Komoroski BJ, Venkataramanan R, Cai H, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Schuetz JD (2001) Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem* 276:39411-8.

-
- ⁹⁶ Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D (2003) Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38:374-84.
- ⁹⁷ Zelcer N, Saeki T, Bot I, Kuil A, Borst P (2003) Transport of bile acids in multidrug-resistance-protein 3-overexpressing cells co-transfected with the ileal Na⁺-dependent bile-acid transporter. *Biochem J* 369:23-30. .
- ⁹⁸ Zollner G, Fickert P, Fuchsbichler A, Silbert D, Wagner M, Arbeiter S, Gonzalez FJ, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H, Trauner M (2003) Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol* 39:480-8.
- ⁹⁹ Hoda F, Green RM (2003) Hepatic canalicular membrane transport of bile salt in C57L/J and AKR/J mice: implications for cholesterol gallstone formation. *J Membr Biol* 196:9-14.
- ¹⁰⁰ Lin JH, Yamazaki M (2003) Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet* 42:59-98.
- ¹⁰¹ Zhang Y, Bachmeier C, Miller DW (2003) In vitro and in vivo models for assessing drug efflux transporter activity. *Adv Drug Deliv Rev* 55:31-51.
- ¹⁰² Xia CQ, Milton MN, Gan LS (2007) Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models. *Curr Drug Metab* 8:341-63.
- ¹⁰³ Ozvegy C, Litman T, Szakács G, Nagy Z, Bates S, Váradi A, Sarkadi B (2001) Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 285:111-7.
- ¹⁰⁴ Ozvegy C, Váradi A, Sarkadi B (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem* 277:47980-90.
- ¹⁰⁵ Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, Scarborough GA (1992) Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem* 267:4854-8.
- ¹⁰⁶ van Asperen J, van Tellingen O, Sparreboom A, Schinkel AH, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH (1997) Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833. *Br J Cancer* 76:1181-3.
- ¹⁰⁷ van Herwaarden AE, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JH, Beijnen JH, Schinkel AH (2003) The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* 63:6447-52.

-
- ¹⁰⁸ Evers R, Cnubben NH, Wijnholds J, van Deemter L, van Bladeren PJ, Borst P (1997) Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Lett* 419:112-6.
- ¹⁰⁹ Suzuki H, Sugiyama Y (1998) Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin Liver Dis* 18:359-76.
- ¹¹⁰ Wang R, Lam P, Liu L, Forrest D, Yousef IM, Mignault D, Phillips MJ, Ling V (2003) Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology* 38:1489-99.
- ¹¹¹ Lam P, Wang R, Ling V (2005) Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry* 44:12598-605.
- ¹¹² Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS Jr, DiPietro JA (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 48:684-5.
- ¹¹³ Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11:727-33.
- ¹¹⁴ Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA (2003) Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *J Am Vet Med Assoc* 223:1453-5.
- ¹¹⁵ Lankas GR, Cartwright ME, Umbenhauer D (1997) P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:357-65.
- ¹¹⁶ Umbenhauer DR, Lankas GR, Pippert TR, Wise LD, Cartwright ME, Hall SJ, Beare CM (1998) Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicol Appl Pharmacol* 146:88-94.
- ¹¹⁷ Elferink RP, Ottenhoff R, Liefting W, de Haan J, Jansen PL (1989) Hepatobiliary transport of glutathione and glutathione conjugate in rats with hereditary hyperbilirubinemia. *J Clin Invest* 84:476-83.
- ¹¹⁸ Kurisu H, Kamisaka K, Koyo T, Yamasuge S, Igarashi H, Maezawa H, Uesugi T, Tagaya O (1991) Organic anion transport study in mutant rats with autosomal recessive conjugated hyperbilirubinemia. *Life Sci.* 49:1003-11.
- ¹¹⁹ Ujhelly O, Ozvegy C, Várady G, Cervenak J, Homolya L, Grez M, Scheffer G, Roos D, Bates SE, Váradi A, Sarkadi B, Németh K (2003) Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Hum Gene Ther* 14:403-12.

-
- ¹²⁰ Bathori Gy, Mehn D, Pal A, Krajcsi P, Szente L, Fenyvesi E, Telbisz A, Sarkadi B, Varadi A, Kis E, Molnar E, Gedey S, Glavinas H, Nagy T, Nemeth A. Test systems for transporter proteins. Patent, P0600408 (2006)
- ¹²¹ Contreras, J.A., Castro, M., Bocos, C., Herrera, E. and Lasuncion, M.A (1992) Combination of an enzymatic method and HPLC for the quantitation of cholesterol in cultured cells. *J Lipid Res* 33: 931-936.
- ¹²² Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-108.
- ¹²³ Dixon, M (1972) The graphical determination of K_m and K_i. *Biochem J* 129:197-202.
- ¹²⁴ Noe, J., B. Stieger, and P.J. Meier (2002) Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 123:1659-66.
- ¹²⁵ Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ (2002) The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123:1649-58.
- ¹²⁶ Bacso Z, Nagy H, Goda K, Bene L, Fenyvesi F, Matkó J, Szabó G (2004) Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein. *Cytometry A* 61:105-16.
- ¹²⁷ Tietz P, Jefferson J, Pagano R, Larusso NF (2005) Membrane microdomains in hepatocytes: potential target areas for proteins involved in canalicular bile secretion. *J Lipid Res* 46:1426-32.
- ¹²⁸ Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV (2001) Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system *Hepatology* 33:1223-31.
- ¹²⁹ Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ (2000) Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118:422-30.
- ¹³⁰ Funk C, Pantze M, Jehle L, Ponelle C, Scheuermann G, Lazendic M, Gasser R (2001) Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology* 167:83-98.
- ¹³¹ Van der Heijden JW, Oerlemans R, Tak PP, Smeets TJM, Scheper RJ, Scheffer GL, Assaraf YG, Lems WF, Dijkmans AC, Jansen G. Expression of the Multi-Drug Resistance Protein BCRP in Synovial Tissue of RA-Patients- A Marker for Inflammation or Resistance to MTX? *Arthritis Rheum* 52 (Suppl): S540.

-
- ¹³² Zaher H, Khan AA, Palandra J, Brayman TG, Yu L, Ware JA (2006) Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Mol Pharm* 3:55-61.
- ¹³³ Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW and Schneider E (2002) Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* 62:5035-5040.
- ¹³⁴ Volk EL, Rohde K, Rhee M, McGuire JJ, Doyle LA, Ross DD and Schneider E (2000) Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res* 60:3514-3521.
- ¹³⁵ Jani M, Szabó P, Kis E, Molnár E, Glavinas H, Krajcsi P (2009) Kinetic characterization of sulfasalazine transport by human ATP-binding cassette G2. *Biol Pharm Bull* 32:497-9.
- ¹³⁶ Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Dahlhaus F, van Eijndhoven MA, de Wolf CJ, Kuil A, Beijnen JH, Scheffer GL, Jansen G, Borst P, Schellens JH (2007) The effect of low pH on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models. *Mol Pharmacol* 71:240-9.
- ¹³⁷ Kremer Joel M (1999) Methotrexate and Leflunomid: Biochemical Basis for Combination Therapy in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 29:14-26.
- ¹³⁸ Dendooven A, Rycke L De, Verhelst X, Mielants H, Veys E M, De Keyser F (2006) Leflunomid and methotrexate combination therapy in daily clinical practice. *Ann Rheum Dis* 65:833-834.
- ¹³⁹ Kiely P D W and Johnson D M.(2002) Infliximab and leflunomid combination therapy in rheumatoid arthritis: an open-label study. *Rheumatology* 41:631-637.
- ¹⁴⁰ Kalden J R, Smolen J S, Emery P, van Riel P L C M, Dougados M, Strand C V, Breedveld F C (2004) Leflunomid in Combination Therapy. *J Rheumatol*.31:Suppl 71:25-30.
- ¹⁴¹ Weinblatt ME, Kremer JM, Coblyn JS, Maier AL, Helfgott SM, Morrell M, Byrne VM, Kaymakcian MV, Strand V (1999) Pharmacokinetics, safety, and efficacy of combination treatment with methotrexate and leflunomid in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42:1322-8.
- ¹⁴² Kremer JM, Genovese MC, Cannon GW, Caldwell JR, Cush JJ, Furst DE, Luggen ME, Keystone E, Weisman MH, Bensen WM, Kaine JL, Ruderman EM, Coleman P, Curtis DL, Kopp EJ, Kantor SM, Waltuck J, Lindsley HB, Markenson JA, Strand V, Crawford B, Fernando I, Simpson K, Bathon JM. (2002) Concomitant Leflunomid Therapy in Patients with Active Rheumatoid Arthritis despite Stable Doses of Methotrexate - A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann Intern Med* 137:726-33.
- ¹⁴³ van der Heijden JW, Oerlemans R, Tak PP, Assaraf YG, Kraan MC, Scheffer GL, van der Laken CJ, Lems WF, Scheper RJ, Dijkmans BA, Jansen G (2009) Involvement of breast cancer resistance

protein expression on rheumatoid arthritis synovial tissue macrophages in resistance to methotrexate and leflunomide. *Arthritis Rheum* 60:669-77.

¹⁴⁴ Green, R.M., F. Hoda, and K.L. Ward (2000) Molecular cloning and characterization of the murine bile salt export pump. *Gene* 241:117-23.

¹⁴⁵ Altmann F, Staudacher E, Wilson IB, März L (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J* 16:109-23.

¹⁴⁶ Paulusma CC, de Waart DR, Kunne C, Mok KS, Elferink RP (2009) Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content. *J Biol Chem* 284:9947-54.

¹⁴⁷ Ismail MG, Häusler S, Stuermer CA, Guyot C, Meier PJ, Roth J, Stieger B (2009) ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes. *Hepatology* 49:1673-82.

¹⁴⁸ Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B, Meier PJ (2001) The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther* 69:223-31.

¹⁴⁹ Pessayre D, Larrey D, Funck-Brentano C, Benhamou JP (1985) Drug interactions and hepatitis produced by some macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 16 Suppl A:181-94.

¹⁵⁰ Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Phillips MJ, Ling V (2001) Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2011-6.

¹⁵¹ Elamiri A, Perwaiz S, Tuchweber B, Yousef IM (2003) Effect of mdr2 mutation with combined tandem disruption of canalicular glycoprotein transporters by cyclosporine A on bile formation in mice. *Pharmacol Res* 48:467-72.

¹⁵² Glavinas H, Méhn D, Jani M, Oosterhuis B, Herédi-Szabó K, Krajcsi P (2008) Utilization of membrane vesicle preparations to study drug-ABC transporter interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:721-32.